

表3-3検水回収率

試料1

機関番号 検査法	ディスク菌数 菌数/5	処理後 の菌数	回収率	平均回収 率
1 遠心法 加熱処理	1210	85	7.0	2.6 CV% 96.7
		30	2.5	
		10	0.8	
		25	2.1	
		10	0.8	
1 ろ過法 加熱処理	1210	150	12.4	16.3 CV% 17.1
		215	17.8	
		195	16.1	
		240	19.8	
		185	15.3	
2 ろ過法 加熱処理	328	135	41.2	41.8 CV% 18.0
		180	54.9	
		120	36.8	
		125	38.1	
		125	38.1	
4 ろ過法 加熱処理	343	0	0.0	0.0 CV% 0.0
		0	0.0	
		0	0.0	
		0	0.0	
		0	0.0	
5 ろ過法 加熱処理	381	0	0.0	0.0 CV% 0.0
		0	0.0	
		0	0.0	
		0	0.0	
		0	0.0	
5 遠心法 酸処理	762	15	2.0	2.4 CV% 105.0
		15	2.0	
		0	0.0	
		50	6.6	
		10	1.3	
6 ろ過法 加熱処理	795	270	34.0	33.8 CV% 34.5
		425	53.5	
		250	31.4	
		190	23.9	
		210	26.4	
6 遠心法 加熱処理 参考値	795	100	12.6	15.5 CV% 30.9
		180	22.6	
		135	17.0	
		80	10.1	
		120	15.1	
6 ろ過法 酸処理	795	580	73.0	77.4 CV% 5.8
		640	80.5	
		655	82.4	
		575	72.3	
		625	78.6	
6 遠心法 酸処理 参考値	795	150	18.9	24.5 CV% 38.5
		305	38.4	
		210	26.4	
		205	25.8	
		105	13.2	
7 ろ過法 加熱処理	560	0	0.0	0.2 CV% 223.6
		5	0.9	
		0	0.0	
		0	0.0	
		0	0.0	
8 ろ過法 酸処理	416	280	67.3	62.5 CV% 48.7
		360	86.5	
		140	33.7	
		400	96.2	
		120	28.8	

試料2

機関番号 検査法	ディスク菌数 菌数/5	処理後 の菌数	回収率	平均回収 率
1 遠心法 加熱処理	4720	365	7.7	19.4 CV% 34.8
		960	20.3	
		1015	21.5	
		1055	22.4	
		1185	25.1	
1 ろ過法 加熱処理	4720	1255	26.6	25.5 CV% 18.1
		1385	29.3	
		1225	26.0	
		830	17.6	
		1325	28.1	
2 ろ過法 加熱処理	2640	1020	38.6	33.8 CV% 22.1
		905	34.3	
		795	30.1	
		615	23.3	
		1120	42.4	
4 ろ過法 加熱処理	2330	20	0.9	1.5 CV% 0.4
		35	1.5	
		25	1.1	
		40	1.7	
		55	2.4	
5 ろ過法 加熱処理	4560	415	9.1	11.1 CV% 32.1
		265	5.8	
		595	13.0	
		655	14.4	
		13.2		
5 遠心法 酸処理	9120	50	0.5	3.4 CV% 76.6
		125	1.4	
		310	3.4	
		405	4.4	
		640	7.0	
6 ろ過法 加熱処理	3850	1335	34.7	40.1 CV% 21.0
		2005	52.1	
		1770	46.0	
		1290	33.5	
		1325	34.4	
6 遠心法 加熱処理 参考値	3850	210	5.5	10.2 CV% 34.4
		435	11.3	
		300	7.8	
		465	12.1	
		545	14.2	
6 ろ過法 酸処理	3850	3670	95.3	78.7 CV% 14.6
		3250	84.4	
		2950	76.6	
		2545	66.1	
		2740	71.2	
6 遠心法 酸処理 参考値	3850	355	9.2	17.4 CV% 45.1
		930	24.2	
		335	8.7	
		785	20.4	
		935	24.3	
7 ろ過法 加熱処理	4200	0	0.0	0.6 CV% 155.3
		5	0.1	
		25	0.6	
		100	2.4	
		5	0.1	
8 ろ過法 酸処理	5040	2780	55.2	55.3 CV% 8.7
		2860	56.7	
		2900	57.5	
		3020	59.9	
		2380	47.2	

表4 濃縮法による回収率の違い

	試料1		試料2	
	ろ過法	遠心法	ろ過法	遠心法
回答数	n=40	n=15	n=40	n=15
回収率	54.9	21.9	65.4	22.9
CV%	28.6	21.9	28.0	14.3

表5 酸または加熱処理の回収率の違い

	試料1		試料2	
	加熱	酸	加熱	酸
回答数	n=45	n=20	n=45	n=20
回収率	28.4	64.0	33.6	66.0
CV%	27.2	30.5	22.2	26.0

表6 配付ディスクの菌数

	試料1		試料2	
	前	後	前	後
検査数	n=9	n=13	n=9	n=13
ディスク菌数	5.4×10^3	2.2×10^3	2.7×10^4	2.0×10^4
CV%	25.5	42.9	12.4	23.4

*: CFU/ml

表7 検査行程の組み合わせによる回収率

	試料1		試料2	
	ろ過法	遠心法	ろ過法	遠心法
酸処理	69.9(n=10)	13.4(n=10)	67.0(n=10)	10.4(n=10)
CV%	31.4	99.5	22.2	88.8
加熱処理	15.3(n=30)	9.1(n=10)	18.8(n=30)	14.8(n=10)
CV%	120.3	84.6	91.6	47.6

別添 1

ディスクを用いたレジオネラ精度管理の菌数測定方法および回答方法

1 送付したもの

セラムチューブ 2本 (試料1、試料2:ゼラチン・ディスク各5枚)

注意:到着後、すぐに菌数検査を行わない場合には、試料を凍結保存(できれば、 -35°C 以下)してください。

GVPC 培地 (100枚) 追加で菌数測定を行っていただける機関は、培地も追加になっています。

PBS 試薬 (1袋)

メンブランフィルター15枚 (予備5枚、ISOPORE $0.2\mu\text{m}$ GTTP シボア ポリカーボネート製)

ろ過濃縮を行っている地研では、これを使用してください。

このフィルターは、滅菌してありません。必要があれば事前に滅菌してください。

2 方法

準備するもの

希釈 PBS 溶液:当所から送付した PBS 試薬の全量を蒸留水 1,000ml に溶解し、原液とする。(保存の場合は滅菌)蒸留水で 50 倍希釈し、滅菌後検水や希釈液に使用する。

検水用ボトル:希釈 PBS500ml 入り滅菌ボトル 10 本 (できるだけガラス製)。

培地:当所から送付した GVPC 培地。

その他貴所で菌数測定やレジオネラ属菌検査に使用している器材。

検査方法

- ① 滅菌試験管に希釈 PBS 溶液を 10ml 分注し、ふ卵器等で 36°C に保温しておく。
- ② 当所から送付したディスク 1 枚をピンセット等を使用して①の希釈 PBS 溶液に入れる。(試験管の壁に付くことがあるので希釈 PBS 溶液中に完全に入ったことを確認する。)追加で菌数測定をしていただける場合は、当所から送付したディスク 2 枚を①の希釈 PBS 溶液に入れ、完全に溶解後希釈 PBS 溶液を 10ml 追加してください。
- ③ ふ卵器 (レジオネラ等の培養温度) に入れて 10 分程度保温し、ディスクを溶解させる。
- ④ ふ卵器から出して 10 秒程度ボルテックス等で、ディスクが完全に溶解するまで攪拌する。(ディスクが透明のため見にくいので完全に溶解していることを確認してください。)

⑤ 試料 1 は、その溶液を平板 2 枚に各 0.1ml 接種し、さらに 1 段階 (10^{-1})、試料 2 は 2 段階 (10^{-2}) まで希釈を行い菌数を測定する。→菌数測定

⑥ 用意しておいた希釈 PBS500ml 入りボトル 5 本に④のディスク溶解液を各々 1ml 接種し、よく攪拌したものを検水とする。

⑦ 貴所で通常行っているレジオネラ検査の方法で検水を濃縮する。

ろ過濃縮を行っている場合は、検体容器に希釈 PBS30ml を加え、よく攪拌して内側を洗いこれもろ過する。これを 2 回繰り返す。その後、ピペットで希釈 PBS をホルダー内にかけてホルダー内を洗いろ過する。フィルターを希釈 PBS5ml に再浮遊する。この際、フィルターが、希釈 PBS 内にあることを確認しながらボルテックスで 1 分間攪拌する。

冷却遠心法を行っている場合は、遠心後希釈 PBS を最初に 2ml 入れピペッティングで管壁をよく洗った後この菌液を別の容器に移す。さらに希釈 PBS 2ml を加えピペッティングを 50 回以上行い、管壁をよく洗った後ピペットで菌液を容器に移し、全量 5ml とする。

⑧ ここから試料 1 は原液を、試料 2 は原液と 1 段階希釈 (10^{-1}) 液を平板 2 枚に各 0.1ml を接種し菌数測定を行う。→菌数測定

⑨ 再浮遊させた溶液を貴所で通常行っている方法で酸または熱処理を行い、試料 1 は原液を、試料 2 は原液と 1 段階希釈 (10^{-1}) 液を平板 2 枚に各 0.1ml を接種し菌数測定を行う。→菌数測定

⑩ ⑤⑧⑨の菌数測定結果を記入する。検査方法についても記入してください。

3 注意事項

- (1) 酸処理を行った場合は菌数を 2 倍するなど菌数の補正をしてください。
- (2) 菌数測定を行う際には、送付した GVPC 培地で菌数を測定してください。
- (3) ディスクは、溶解の際、均一に溶解するため必ず加温をしてください。
- (4) ディスク溶解後は、速やかに検査を行ってください。
- (5) 回答欄は、適宜コピーをして記入してください。
- (6) 次のページに図があります。

図1 試験方法

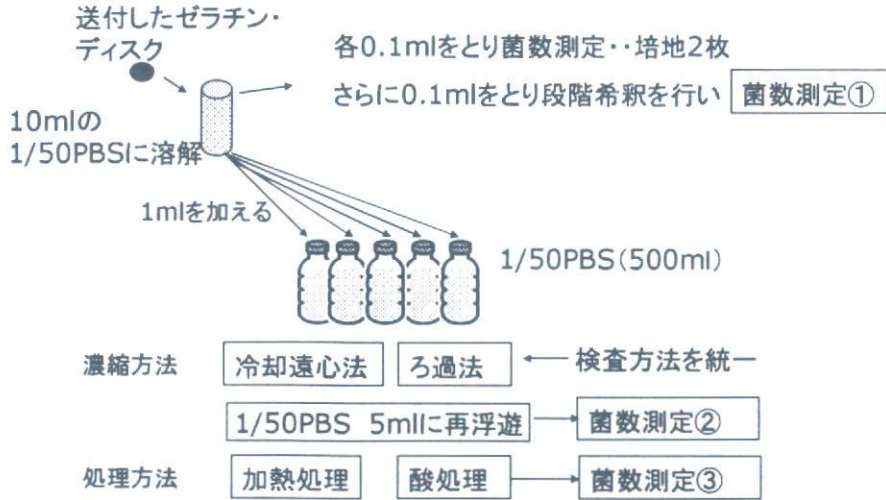
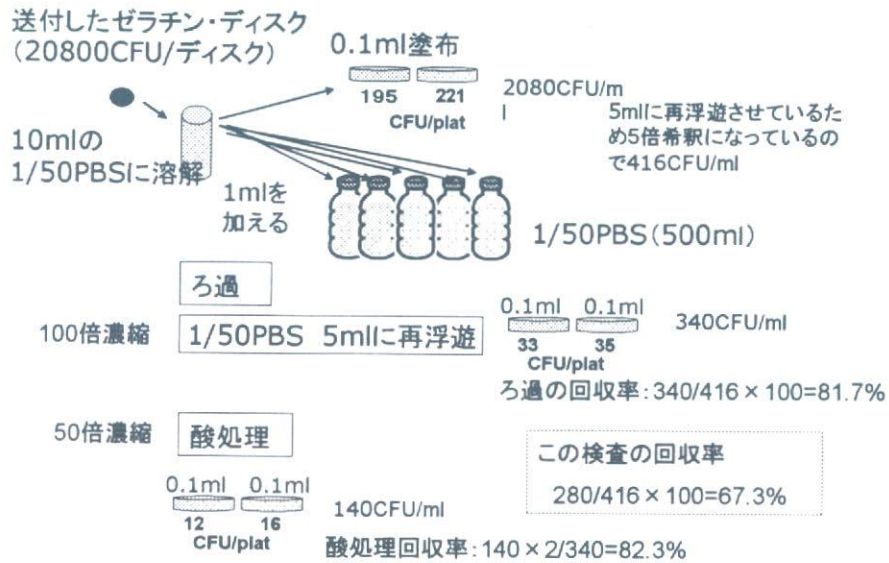


図2 回収率の算出



別添 2

検査方法記入表

検査方法記入表

検査方法について	回答(例)	回答
1:地研名	神奈川県衛生研究所	
2:担当者名	渡辺祐子	
3:メールアドレス	watanabe.nfa0@pref.kanagawa.jp	
4:ディスクの到着日時	2007/10/23	
3:検査開始までの保存方法	冷凍庫保存(-40℃)	
5:検査日	2007/10/25	
6:検水量(ml)	500ml	500ml
7:濃縮法 a:ろ過法 b.冷却遠心法	a	
a:ろ過法		
フィルターの素材 1. ポリカーボネート 2. ニトロセルロース 3. その他()	1	
フィルターのポアサイズ 1. 0.2μm 2. 0.4μm 3. その他(μm)	1	
神奈川県から発送したフィルター	○	
b.冷却遠心法		
回転数	6000rpm 4000g	rpm g
遠心時間	20分	分
上清の除去方法 1. デカンテーション 2. ピペットング 3. その他()	1	
8:濃縮倍率	100倍	倍
9:再浮遊量	5mL	mL
10:雑菌処理法 a:加熱処理 b:酸処理 c:加熱、酸処理併用	c	
a:加熱処理		
加熱時間	分	分
加熱温度	℃	℃
b:酸処理		
酸処理時間	分	分
c:加熱後酸処理		
加熱処理温度	50℃	℃
加熱処理時間	20分	分
酸処理時間	4分	分
11:使用培地 (⑤の菌数カウント)	GVPC	
12:使用培地 (⑦の菌数カウント)	GVPC	
13:使用培地 (⑧の菌数カウント)	GVPC	
17:特記事項、ご意見等		

別添 3

菌数測定結果

地研名 _____

試料1

⑤

希釈倍率	1	2	3			
1						
2						
⑤の菌数 CFU/ml				#####	#####	#####

⑦

希釈倍率	1	2	3	4	5			
原液								
⑦の菌数 CFU/ml						#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

⑧

希釈倍率	1	2	3	4	5			
原液								
⑧の菌数 CFU/ml						#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

試料2

⑤

希釈倍率	1	2	3			
1						
2						
⑤の菌数 CFU/ml				#####	#####	#####

⑦

希釈倍率	1	2	3	4	5			
原液								
10 ⁻¹								
⑦の菌数 CFU/ml						#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

⑧

希釈倍率	1	2	3	4	5			
原液								
10 ⁻¹								
⑧の菌数 CFU/ml						#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

平成 20 年度分担研究報告書

DNA-DNA ハイブリダイゼーション法によるレジオネラ属菌種の同定法の確立

研究分担者 山崎 利雄 国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室
前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部

研究概要

市販 DDH キットで同定できないレジオネラ属菌種を、DDH 法により同定可能にすることを最終目標に、今年度は、固定する基準株の選定、追加したレジオネラ属菌種の基準株間の相対類似度の測定・検査精度の検討を行った。*L. busanensi*、*L. greisilensis*、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii*の5菌種のDDH法による同定が可能になり、この方法により、日本の環境水から分離されたがこれまで不明であったレジオネラ属菌株の菌種が同定された。

A. 研究目的

レジオネラ症は、レジオネラ属菌によって引き起こされる細菌感染症である。レジオネラ属菌は、土壌や沼地や、冷却塔、室内加湿器、給湯設備、循環式浴槽や、温泉など自然界に広く分布存在する環境細菌である。また、レジオネラ属菌は、アメーバの中で増殖する事が知られている。レジオネラ属菌は、約50種が報告されている。しかし、既存のDNA-DNAハイブリダイゼーション(DDH)キット(極東製薬工業)では25種しか同定できない。浴槽水から*Legionella londiniensis*、*L. nautarum*等が検出されているが、キットにはない。代用する16S rRNA遺伝子の塩基配列決定では、登録されているレジオネラ属菌の塩基配列と一致しないことも多く、同定できる感度は低い。その為、既存のキットにないレジオネラ属菌種を、同定可能なDDH法用プレートを試作する事を最終目的とし、昨年度は、既同定済みのレジオネラ属菌株を用いて、文献を参考にしてDDH法用プレートの基準株DNA

のプレートへの固定方法について検討し、基準株DNA固定プレートを作製する事が可能になったと報告した。今年度は、市販DDHで同定できないレジオネラ菌種を選定し、それらの基準株間の相対類似度の測定を行い、菌種同定可能かどうかを調べた。また、塩基配列決定法で既に同定された菌株を用いて検査精度の検討も行った。

B. 研究材料と研究方法

1、使用菌：市販DDHで同定できないレジオネラ属菌種の基準株で、*L. busanensis* ATCC BAA-518、*L. greisilensis* ATCC 700509、*L. londiniensis* ATCC49505 (SG1)・ATCC700510(SG2)、*L. nautarum* ATCC49506、*L. quinlivanii* ATCC 43830 (SG1)・ATCC BAA-538 (SG2)の5菌種7株を用いた。また、既に、16S rRNA遺伝子の塩基配列決定法にて同定した当研究所保存の環境分離菌2株と16S rRNA遺伝子の塩基配列決定法にて同定できなかった環境分離菌3株を用いた。

2、基準株 DNA の準備：BCYE α 培地にて35℃で4日間培養したレジオネラ属菌を、リゾチーム-SDSにて抽出して得られた粗DNA溶液を、フェノール-クロロホルム処理後、エタノールを加えてDNAを析出させ、ガラス棒にて巻き取り、再溶解させたDNAをRNase処理後、フェノール-クロロホルムにて再精製後、エタノール沈殿を行った。DNAをTE-緩衝液に再溶解させ、DNA量と純度を測りDDH法用プレート作製に供した。

3、基準株固定プレートの作製：0.1 M MgCl₂含有PBSにて5 μ g/mlの濃度に調整した基準株DNAを、100℃で5分間加熱後、急冷して1本鎖にし、100 μ lずつマイクロプレート(Nunc 468667)に分注し、30℃で1晩放置し、固定させた。溶液を破棄後、0.1 M MgCl₂含有PBSにて50pg/mlの濃度に調整したサケ精子DNAを、100℃で10分間加熱後、急冷して1本鎖にし、300 μ lずつマイクロプレートに分注し、37℃2時間プレハイブリダイゼーションを行った。溶液を破棄後、50℃で2時間プレートを乾燥させた。プレートを遮光性の袋に入れ、乾燥剤をいれて保存した。

4、DDH法：被検菌より抽出・精製したDNAに標識試薬を100 μ l加え、500Wの水銀灯下で10分間DNAの標識を行った。アルカリ法により一本鎖化後、ハイブリダイゼーション試薬を加えてから、基準株を固定させたプレートに100 μ lずつ分注し、50℃で1時間30分間ハイブリダイゼーションを行った。1XSSCで3回洗浄後、発色酵素100 μ lを加え、37℃10分間放置した。その後、1XSSCで3回洗浄、発色基質100 μ lを添加し、発色後5-10分以内にELISAプレートリーダー(BIO-RAD社)を用いて630nmの吸光度を測定した。最も強く反応したウエルの吸光度(Max. Abs.)が対照ウエルの吸光度(Blank Abs.)の1.9倍以上でかつ、2番目に高い吸光度(2nd. Abs.)を示したウエルの相対類似度が70%以下の時の結果を採用し、この基準に達しないものは判定不可とした。相対類似度(%)は(2nd. Abs. - Blank abs. / Max. Abs. - Blank Abs.) \times 100として計算した。また、発色を吸光度測定後、すぐに写真撮影を行った。試薬類は、既存のDDHレジオネラキット(極東製薬工業)内の物を用いた。

5、環境分離菌株の同定：既に、16S rRNA遺伝子の塩基配列決定法にて同定した当研究所保存の環境分離菌2株と16S rRNA遺伝子の塩基配列決定法にて同定できなかった環境分離菌3株を用いて、作製したプレートを用いてDDH法を実施した。

C. 研究結果

1、市販DDHキットで同定できないレジオネラ属菌種の基準株を用いたDDH法の検討および基準株間の相対類似度

基準株として、*L. busanensis* ATCC BAA-518、*L. greisilensis* ATCC 700509、*L. londiniensis* ATCC49505 (SG1)・ATCC700510 (SG2)、*L. nautarum* ATCC49506、*L. quinlivanii* ATCC 43830 (SG1)・ATCC BAA-538 (SG2)の5菌種7株を固着させたプレートを用いて、同じ基準株を被験菌としてDDHを行った結果を図1に示した。肉眼的には、5菌種間の区別は可能であった。また、*L. busanensis*と*L. greisilensis*は非常に近い菌種である事がわかった。

発色基質添加後5分以内にELISAプレートリーダーを用いて吸光度を測定した。基準株が*L. busanensis*と*L. greisilensis*は、50%の相対類似度であり、判定基準に照らし合わせると、70%以下の相対類似度であったので同定可能であった。また、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii*はそれぞれ同定可能であった。*L. londiniensis* SG1とSG2は70%以上の相対類似度であったので、血清群の違いによらず*L. londiniensis*と同定可能であった。同様に、*L. quinlivanii* SG1とSG2も70%以上の相対類似度であったので血清群の違いによらず、*L. quinlivanii*と同定可能であった。

2、市販のDDHキットと自家製プレートの組み合わせによる基準株の同定試験

基準株*L. pneumophila*、*L. busanensis*、*L. greisilensis*、*L. londiniensis*の4菌種を用いて、市販DDHキット内の25菌種同定可能プレートと自家製プレートの組み合わせによるDDH試験を行った結果を図2に示す。いずれの菌種も基準株が固着されている箇所の発色がもっとも強く2番目に発色した箇所との相対類似度が70%以下であり、肉眼的にみても、菌種の同定が可能であった。

3、16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定法にて同定不能であった環境分離菌株の同定

市販の DDH キットでは同定不能で、16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定法では同定可能であった環境分離菌 NIIB1127、NIIB1256、NIIB2435 の3株は、DDH 法でも塩基配列決定法にて同定された菌種名と同じであった。塩基配列決定法にて同定不能であった環境分離菌 NIIB1220 株、NIIB1221 株、NIIB1655 株は、それぞれ *L. quinlivanii*、*L. busanensis*、*L. busanensis* と同定された。(表 2、図 3)

D. 考察

レジオネラ属は、ほとんどの菌種が極鞭毛を持ち、繊毛を有するが、莢膜及び芽胞はもたない太さ 0.3–0.7 μm 、長さが 2–5 μm のグラム陰性の中央がやや膨らんだ短桿菌である。増殖には、L-システインとピロリン酸鉄あるいは硝酸鉄、 α -ケトグルタル酸を加えた buffered charcoal yeast extract (BCYE α) 寒天培地を用いて培養する。36°C で 3–7 日間で灰白色、光輝性、凸状、正円のコロニーが形成される。生化学的性状では、糖の酸化、醗酵もせず、アミノ酸を炭素源として利用するが、生化学検査法で陽性となる項目が少ないため、菌種名の同定が難しい。したがって、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分類が行われている。しかし、被検菌の塩基配列が、標準菌種の塩基配列と完全に一致しない事も多く、作業が煩雑であるため、一般の検査室では、塩基配列決定法による同定は難しい。そのために、レジオネラ菌種の同定を簡便にする DDH 法のキットが市販されている。ところが、25 菌種しか同定できない。そこで、既存キットにない菌種を、簡単に同定する標準的な方法として、昨年度は、レジオネラ属菌用 DDH 法プレートを作製するために、参考文献を参考に試行錯誤を繰り返して、基準株の DNA のプレートへの固定方法を確立した。そこで、今年度は、既存の DDH キット(極東製薬工業)では同定できない *L. busanensis*、*L. greisilensis*、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii* の基準株を DDH 法プレートに固着させて、菌種間の相対類似度を測定した。血清群によらず、テストした菌種の同定は可能となった。

また、16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定法では同定不能であった環境分離菌株について DDH 法を行い、菌種の同定が可能となった。このように、既存の市販キットと自家製プレートを組み合わせる事により、より多くのレジオネラ属菌の同定が簡単にできるであろう。

市販プレートと自家製プレートを用いて、研究所保存のレジオネラ属菌について DDH 法を行い、更に信頼性の高い検査法にするとともに、自家製プレートを他施設の研究班員に配り、分離されたレジオネラ属菌に使ってもらい、その信頼性を確かめることも今後の課題として残っている。

E. 結論

16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定法では同定不能であった場合、市販 DDH キットで同定できないレジオネラ属菌種である *L. busanensis*、*L. greisilensis*、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii* の 5 菌種の同定が、DDH 法でも可能になった。

F. 参考文献

- 1) Ezaki, T., Y. Hashimoto, N., Takeuchi, H., Yamamoto, S.-L., Liu, H., Miura, K., Matsui, and E. Yabuuchi. 1988. Simple genetic method to identify viridans group streptococci by colorimetric dot hybridization and fluorometric hybridization in microdilution wells. *J. Clin. Microbiol.* 26:1708-1713.
- 2) Ezaki, T., Y. Hashimoto, and E. Yabuuchi. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:224-229.
- 3) Ezaki, T., Y. Hashimoto, H. Yamamoto, M. L. Lucida, S.-L. Liu, S. Kusunoki, K. Asano, and E. Yabuuchi. 1990. Evaluation of the microplate hybridization method for rapid

4) Kusunoki, S., Ezaki, T., Tamesada, M., Hatanaka, Y., Asano, K., Hasimoto, Y., and E. Yabuuchi. 1991. Application of colorimetric microdilution plate Hybridization for Rapid Genetic Identification of 22 Mycobacterium Species. J. Clin. Microbiol. 29:1596-1603.

G. 研究発表

1. 論文発表

鳥谷竜哉, 黒木俊郎, 大谷勝実, 山口誠一, 佐々木美江, 齊藤志保子, 藤田雅弘,

杉山寛治, 中嶋洋, 村上光一, 田栗利紹, 藏元強, 倉文明, 八木田健司, 泉山信司, 前川純子, 山崎利雄, 縣邦雄, 井上博雄、
掛け流し式温泉におけるレジオネラ属菌汚染とリスク因子感染症学会誌83:36~44、2009

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

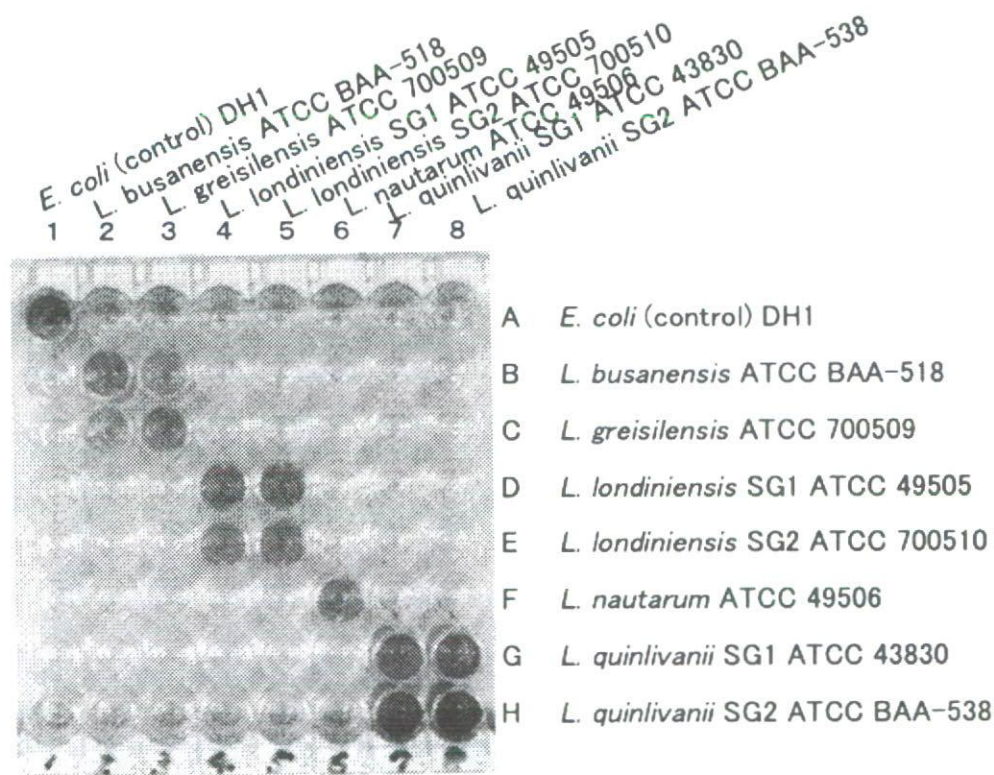


図1 固着した基準株を用いたDDH法同定結果

表1 市販キットにない菌種の基準株間の相対類似度(%)

	<i>L. busanensis</i>	<i>L. greisilensis</i>	<i>L. londiniensis</i> SG1	<i>L. londiniensis</i> SG2	<i>L. nautarum</i>	<i>L. quinlivanii</i> SG1	<i>L. quinlivanii</i> SG2
<i>L. busanensis</i>	100	49	-	-	-	-	-
<i>L. greisilensis</i>	50	100	-	-	-	-	-
<i>L. londiniensis</i> SG1	-	-	100	81	-	-	-
<i>L. londiniensis</i> SG2	-	-	118	100	-	-	-
<i>L. nautarum</i>	-	-	-	-	100	-	-
<i>L. quinlivanii</i> SG1	-	-	-	-	-	100	79
<i>L. quinlivanii</i> SG2	-	-	-	-	-	108	100

-:30%以下

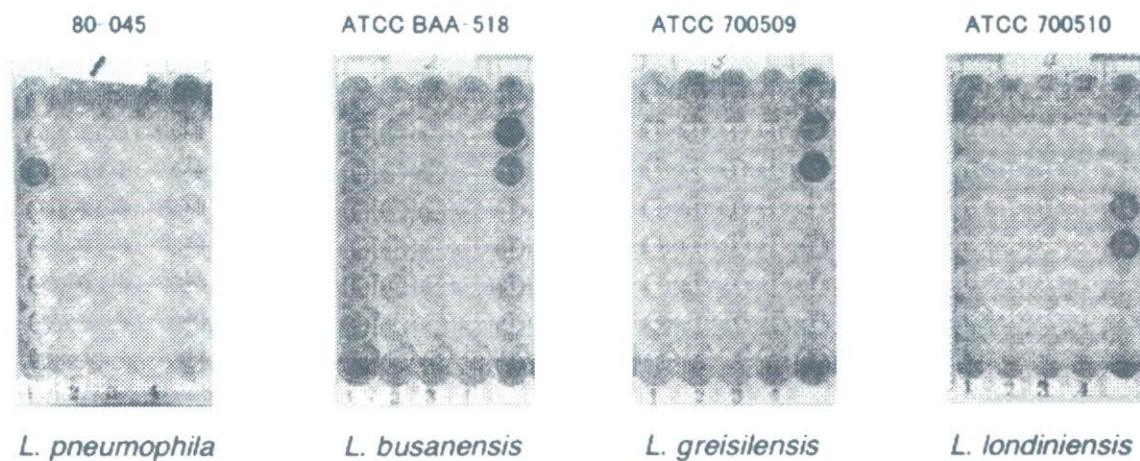


図2 基準株の培養菌を用いたDDH法による同定試験

表2 レジオネラ環境分離菌株の同定

株名	DDH法		塩基配列 決定法	備考
	同定名	2nd菌種名 (相対類似度%)		
1 80-045	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. busanensis</i> (19%)	<i>L. pneumophila</i>	1980年、日本最初のレジオネラ症患者からの分離株
2 NIIB1127	<i>L. nautarum</i>	<i>L. pneumophila</i> (42%)	<i>L. nautarum</i>	2005年、和歌山県温泉タンク水より
3 NIIB1220	<i>L. quinlivanii</i>	<i>L. sainthelensi</i> (9%)	<i>L. quinlivanii</i>	mipの塩基配列で同定(16S rRNAの塩基配列は <i>L. birminghamensis</i> にも近く決定できなかった) 2005年、神奈川県冷却塔水より
4 NIIB1256	<i>L. londiniensis</i>	<i>L. busanensis</i> (8%)	<i>L. londiniensis</i>	16S rRNAの塩基配列で同定(レジオネラ属菌同定のためのLAMP(+))2006年、静岡県掛け流し温泉施設配管より
5 NIIB1221	<i>L. busanensis</i>	<i>L. greisilensis</i> (37%)	<i>L. busanensis</i> <i>L. greisilensis</i>	16S rRNAの塩基配列は <i>L. busanensis</i> と <i>L. greisilensis</i> に最も近い。16SrRNAの上流の配列について、459/468bp <i>L. busanensis</i> と一致(98%)、2番目は454/468bpで <i>L. greisilensis</i> (97%)、あとは95%以下。2005年、神奈川県浴槽水(温泉)より
6 NIIB1655	<i>L. busanensis</i>	<i>L. greisilensis</i> (39%)	<i>L. busanensis</i> <i>L. greisilensis</i>	16SrRNAの上流の配列について、 <i>L. busanensis</i> 99%(471/472)、 <i>L. greisilensis</i> 97%(457/471)。2006年、東京都冷却塔水より
7 NIIB2435)	<i>L. londiniensis</i>	<i>L. sainthelensi</i> (11%)	<i>L. londiniensis</i>	16S rRNAの塩基配列で同定(レジオネラ属菌同定のためのLAMP(-))。2008年、静岡県温泉配管水(風呂洗浄後)より

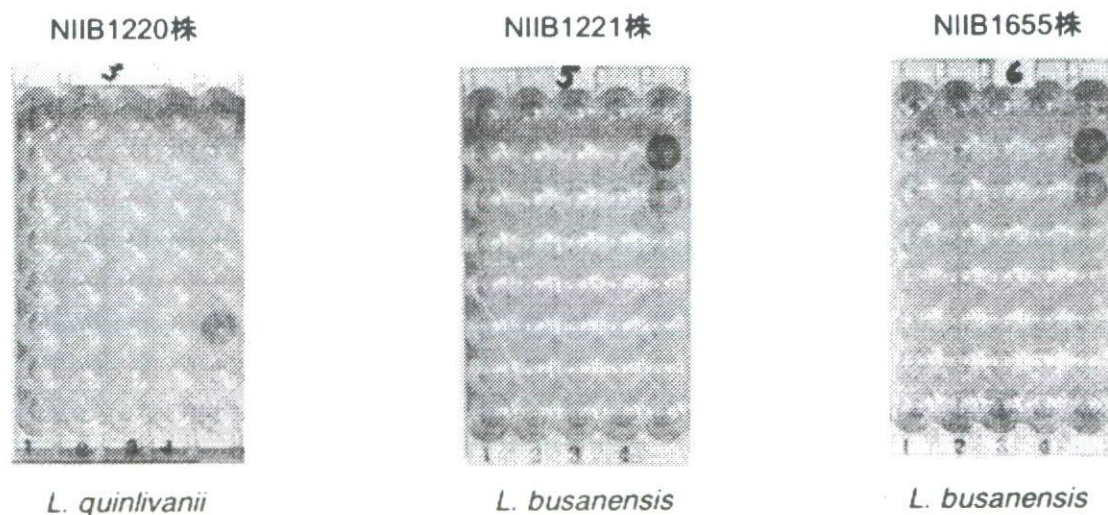


図3 16S rRNAの塩基配列で決定できなかった臨床分離株のDDH法による同定

厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」

研究代表者 倉 文明 国立感染症研究所

平成 20 年度分担研究報告書

ヒト感染性の見られない *Legionella londiniensis* の宿主アメーバ

研究分担者 八木田健司 国立感染症研究所 寄生動物部

概要

ヒト感染性の見られない *Legionella londiniensis* の環境中宿主を調べる目的で、実験室培養している *Acanthamoeba* 株および *Naegleria* 株を用いて同菌の感染実験を行った。*Acanthamoeba* に関しては 13 の遺伝型からなる 29 株を調べたが、Oost 株に 20% 台の感染率が見られたのみで、他株では 0~5.9% の低感染率であった。遺伝型と感染性の関係は認められなかった。一方、*Naegleria* では温度耐性種の *N. fowleri* の株で高感染率(50~90%)が認められた他、*N. lovaniensis*、*N. australiensis* の株でも *L. londiniensis* の感染が認められた。これら *Naegleria* 属アメーバにおける *L. londiniensis* の細胞内増殖性は、病原株の *L. pneumophila* の場合と同等と観察された。以上の結果から、温水環境中から優占的に検出される *Naegleria* 属アメーバが *L. londiniensis* の宿主の一つとして、その定着と増殖に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

前年度の研究において、*Legionella* 属菌の宿主アメーバ(*Acanthamoeba*)に対する感染性の菌種による差を定量的に比較した結果、集団感染事例における調査結果において存在量としては最大ながらヒトへの感染性が認められなかった *L. londiniensis* が、アメーバ感染性をほとんど示さないという結果が得られた。その解釈として、宿主なしでも増殖可能という性質が *Legionella* 属菌に潜在

的に備えられているのか、*Acanthamoeba* の株による親和性の違いが存在するのではないか、あるいは *Acanthamoeba* 以外の宿主の介在があるのではないかという議論があった。そこで本年度は、*L. londiniensis* の宿主検索を目的として、*Acanthamoeba* 株の遺伝型と同菌の感染性の関係、また温泉等温水環境から優占的に検出されることが知られる(八木田、2002) *Naegleria* 属アメーバと同菌の感染性の関係を調べた。

B.材料および方法

1. アメーバ:

試験には無菌培養した *Acanthamoeba* ならびに *Naegleria* 培養株を用いた(表-1)。*Acanthamoeba* 株は PYGC 培地を用いて 25°Cにて培養した角膜炎分離株、環境分離株ならびに ATCC 株合わせて 29 株を用いた。これらの株はいずれもミトコンドリア DNA の RFLP による型別がなされており(Yagita ら、1999)、1 タイプにつき 1~3 株、タイプ総数としては 13 タイプを調べた。なお、ATCC 株には形態的な種名が付けられている。*Naegleria* 株は SCGYE 培地を用いて 30°Cにて培養した国内髄膜炎患者分離株ならびに ATCC 株合わせて 8 株を用いた。国内髄膜炎患者(PAM)分離株は分子生物学的に *N. fowleri* と同定されているもので、他の ATCC 株はいずれもアインザイムパターン等の生化学的手法により同定がされているものである。種としては、*N. fowleri* の他に *N. lovaniensis*、*N. australiensis*、*N. jadini* ならびに *N. gruberi* の計 5 種類を今回調べた。

2. レジオネラ属菌:

試験には *L. londiniensis* NIIB 385 株(浴槽水分離株)ならびに *L. pneumophila* 80-045 株(SG1、臨床分離株)を用いた。同菌株は-80°C凍結保存材料を BCYE α 培地(DIFCO 製、#218301)に接種後 3 日間、30°Cにて培養したものをを用いた。試験に際しては、下記アメーバ用生理食塩水を用いて必要濃度に調整した。

3. アメーバ用生理食塩水(Amoeba saline: AS)の調整:

A 液(NaCl 12.0g/100ml、MgSO₄ · 7H₂O

0.4g/100ml、CaCl₂ · 2H₂O 0.4g/100ml)、および B 液 (Na₂PO₄ 14.2g/100ml、KH₂PO₄ 13.6g/100ml)を個別作製し、試験に際して A および B 両液を混合して 10 倍あるいは 100 倍に蒸留水により希釈して用いた。10xAS (10 倍希釈 AS)は A および B の元液を直接混合すると沈殿が生ずるため、A 液を先に蒸留水で 5 倍程度に希釈した後に B 液を加え、さらに蒸留水を加えて最終的に両液が 10 倍希釈になるように調整した。調整後の 10xAS はフィルターろ過滅菌して保存した。オートクレーブ処理は沈殿を生ずるため滅菌には不適であった。1xAS (100 倍希釈 AS)は 10xAS をさらに蒸留水で 10 倍希釈することで調整し、同様にろ過滅菌して用いた。

4. レジオネラ属菌液の調整:

BCYE α 培地で培養した菌はループで回収し 4ml の 1xAS に入れ懸濁液を作製し、その 2.5ml を等量の 10%ホルマリン溶液と混合したのち、吸光度(660nm フィルターの O.D.値)から濃度を測定した。得られた O.D. の 2 倍を元液の O.D.とし、これより 1.0 O.D. の菌液を 1xAS により調整し、感染試験に用いた。

5. アメーバ感染実験

培養試験管内で PYGC を用いて培養した *Acanthamoeba* 株ならびに SCGYE を用いて培養した *Naegleria* 株は、培養試験管を氷水にて冷却することで管壁より剥離し、アメーバ浮遊液を別の遠心管に移し遠心を行った(500xg、3 分間)。上清を除去し、沈殿を 2ml の PBS(-)で再浮遊させ再び遠心後、上清を除去し、10⁵/ml になるように 10xAS で再浮遊させた。12 ウェルのマイクロプレート

(SMIRON)に各アメーバ浮遊液を 1ml 加え、3 時間室温で静置しプレート底面にアメーバがほぼ単層になるように接着させた。接着確認後、上清を吸引除去し、上述のレジオネラ菌液 1ml を各ウェルに加えた。培養は 35°C で行い、24 時間後にアメーバ属に応じて、その培養液である PYGC あるいは SCGYE を 1ml ウェルに添加し、さらに培養を行った。

6. 感染の確認

アメーバと菌の共培養したマイクロプレートをおよそ 15 分間氷水上にのせ、アメーバを剥離させた。ピペッティングでアメーバをウェル内で均一に浮遊させ、遠心管に移して遠心(500xg、3 分間)し、上清を除去した。5ml の 10xAS で沈渣を再浮遊して遠心(500xg、3 分間)、上清を除去した。上清を 0.2ml ほど残してその中でアメーバを再浮遊させ、安全キャビネット内でスライドグラス上にアメーバ浮遊液を塗布し、自然乾燥させた。メタノールで 3 分間固定し自然乾燥後、ギムザ染色を室温にて 30 分間行なった。アメーバ内のレジオネラが容易に確認できるまで適宜水道水で洗浄し、自然乾燥させた。倍率 x 1000 で標本を観察し、菌の感染および細胞内増殖性を定性的に調べた。顕微鏡観察により、任意におよそ 500 アメーバ細胞を観察し、その中のレジオネラ感染アメーバ数の割合を算出した。なお、感染アメーバの定義は、細胞内で 2 分裂以上したレジオネラの確認されたアメーバとした。また宿主アメーバによる細胞内増殖の進行度合いを調べるために、細胞内で形成された菌増殖のクラスターの形態的比較を行なった。

C. 結果

Acanthamoeba 29 株(13 ミトコンドリア DNA タイプ)ならびに *Naegleria* 4 株(4 種)に対する *L. londiniensis* の感染性を調べた結果を表-2 にまとめた。感染の確認は感染後 2 日目に行った。なお、すべての株は *L. pneumophila* による感染で数日のうちに菌の細胞内増殖によりほぼ完全に崩壊することを確認した。一方 *L. londiniensis* 感染試験では、感染後 2 日まではどのアメーバ株でも多数の栄養体が観察された。

Acanthamoeba 株の *L. londiniensis* による感染性を調べた結果であるが、最大の感染率を示したのが Oost 株で、感染率はそれほど高くはなく 21.3%、残りの 28 株にはほとんど感染が見られなかった。そのうちの 9 株は感染率 1.0~5.9%、また 19 株は感染率 1.0%以下を示し、全体として *Acanthamoeba* 属アメーバと *L. londiniensis* の親和性は低かった。全体的な感染率が低いいため *Acanthamoeba* の遺伝型と同菌の感染性の関係については特定の傾向は認められなかった。なお、最大感染率を示した Oost 株は Ma タイプに属するが、同じタイプに属する TJIN 株の場合は 0%、3E 株の場合はやや高いが 4.3%であり、Ma タイプが他タイプよりも感染率が高い傾向にはなかった。一方、*Naegleria* 株に関しては各種より 1 株を選びその感染性を調べたが、最も高い感染率を示したのが KURUME 株(*N. fowleri*)で 84.6%、PP397 株(*N. australiensis*)が 77.6%、ITMAP(I)-400 株(*N. jadini*)が 47.8%および TS 株(*N. lovaniensis*)が 35.2%となり、いずれも *Acanthamoeba* 株でみられた感染率を大きく上回った。KURUME 株では、感染後 1 日において *L. pneumophila* 感染時に見られるのと同様な、細胞内増殖した菌のアメ

ーバ内における活発な運動性が確認された。I-400 株はかなり細胞が膨化、崩壊していたが、これは菌の感染のみならず感染時のメディウムの不適性が原因と考えられた。

L. londiniensis 感染が認められたアメーバ株における同菌の細胞内増殖像を図-1 に示した。高感染率を示した KURUME 株は、全体的に各アメーバ内で細胞内増殖が進行し、大きなクラスター形成が認められ、対照として感染させた *L. pneumophila* と変わらない増殖性が観察された。PP397 株および TS 株も KURUME 株とほぼ同様な細胞内増殖性が観察された。*Acanthamoeba* では唯一高い感染性を示した Oost 株では、*Naegleria* 株に見られたクラスター形成は KURUME 株等と比較して小さく、細胞内増殖が遅いことが示唆された。

Acanthamoeba 株の感染率の低さから、*L. londiniensis* は感染後の細胞内増殖度が宿主によっては異なるため感染の確認に時間的な誤差が生ずる可能性を考え、感染後培養の期間を4日間に延長し、細胞内増殖の可能性を高めた上で感染の有無を調べた。試験には *Acanthamoeba* に関しては感染率の高かった Oost 株および MDC 株、および感染率の低かった Castellani 株と L1a 株を選択し、*Naegleria* に関しては8株を調べた。結果を表-2 に示した。培養4日後でも *Acanthamoeba* 株はシスト化せず、多数の栄養体が観察されたが、*Naegleria* 株は株によりシスト化が進む一方、PP397 および I-400 が死滅した。アメーバの感染率に関しては、*Acanthamoeba* 4株の感染率は2日間培養の結果と比較すると、2日培養で感染率が比較的高かった Oost 株は8.5%、MDC 株が4.2%、感染率の低かった Castellani 株と L1a 株が各々1%以下であり、細胞内増殖はす

すんでいることが観察されるが、感染率そのものの上昇は認められなかった。なお感染率が全体的に低下傾向にあったのは、培養日数延長によるアメーバ数の増加が生じたためと考えられた。一方、4日間培養で生存した *Naegleria* 6株は *N. fowleri* の KURUME 株、Nf66 株ならびに KUL 株は45~80%の高感染率を示した。TS株については2日間培養で35%程度の感染率を示したが、7.9%に低下、Aq/9/1/45D(Aq)株(*N. lovaniensis*)は感染率1%以下、EG株(*N. gruberi*)は感染アメーバが認められなかった。培養期間中、*N. fowleri* の各株、TS株および Aq 株はほぼすべてのアメーバが球形浮遊状態となり、また部分的にシストが進んでおり、アメーバ数の増加傾向には無かった。一方、感染のみられなかった EG 株はほぼ栄養体として生存していた。*Naegleria* 株間での感染率の差を検証するため、再度感染後培養2日間の条件で各株の感染率を調べた。結果を表-4 に示したが、*N. fowleri* 3株の感染率は KURUME 株の87.1%を最高に、KUL 株79.9%、Nf66 株48.6%となり高感染率が確認された一方、PP397 株は28.3%、Aq 株9.1%、TS 株5.7%、EG 株は0.4%であり、種間には感染率の差が見られた。

D. 考察

本研究では、*L. londiniensis* の温水環境中に生息する条件として、他の *Legionella* 属菌と同様、自由生活性アメーバを宿主としているのか、いるとすればその宿主アメーバは何か、について感染実験により解明することを試みた。試験に選んだ *Acanthamoeba* 属アメーバに関しては、他の *Legionella* 属菌の宿主になるという事実を踏まえ、これま

で感染が見られなかった原因を遺伝型による感染性の差であると想定し、多数の遺伝子型の株を調べた。一方、*Naegleria* 属アメーバに関しては浴槽水等の温水環境から高頻度かつ多量に検出され、自由生活性アメーバの中でも優占的に存在する、その生態学的特徴から *L. londiniensis* との関連性を想定し、その感染性を調べた。

結果としては、温度耐性という特徴をもつ *Naegleria* 属アメーバには、*L. pneumophila* と変わらない *L. londiniensis* の細胞内増殖性を示すものが存在することが確認され、温水環境において *L. londiniensis* の宿主の一つとして、*Naegleria* 属アメーバがその定着と増殖を支える役割を果たしている可能性があることが示された。なお本研究で用いた *L. londiniensis* 株の分離された宮崎のレジオネラ集団感染事例においては、ろ過装置を中心に *Naegleria* 属アメーバが実際に検出されており(岡田ら、2005)、同アメーバが *L. londiniensis* の多量検出に結びついたものと推定された。一方、*Acanthamoeba* 属アメーバは感染率の低さから、環境中に共存しても *L. londiniensis* の宿主とはなりえないものと考えられた。今回の結果は、*Legionella* 属菌には宿主なしでも増殖可能という性質が潜在的に備えられているという可能性は否定しないにしても、何らかのアメーバあるいは原生動物を宿主とすることで、環境中における *Legionella* 属菌の生存が成立していることを裏付けるものと考えられた。

本研究から、*L. londiniensis* は少なくとも *L. pneumophila* よりも宿主アメーバ特異性が高いことが示された。*Legionella* 属菌には、*L. londiniensis* のように例え環境中に存在したとしてもヒトへの感染性が見られない菌種が他にも存在するが、このような、いわゆる

非病原性種と *L. pneumophila* に代表される病原種の間で、宿主特異性に一定の関係、例えば非病原性種は *Naegleria* 属には感染するが、*Acanthamoeba* 属には感染しない、というような関係が成立するかどうかは興味深いところである。*L. londiniensis* に関しては *Acanthamoeba* 属ではなく *Naegleria* 属の方が高い感染性を示す理由、また *Naegleria* 属内でも種により感染性が異なる理由は今回調べたアメーバの生物学的な特徴からだけでは説明できず、今後解明すべき課題である。例えば、*Acanthamoeba* 属では *Oost* 株特異的ともいえる株間の感染率の差が見られたが、これは同属アメーバ内の遺伝学的な系統関係とは関連性が見られない。どちらかといえば、突然変異的な変化が高感染率に関連していることが推定される。*Naegleria* 属では、温度耐性能が低い *N. jadinii* および *N. gruberi* の間で、前者が高感染率であったのに対し、後者の感染率はほとんどないという結果は、単に温度耐性に適応するアメーバ細胞内環境が *L. londiniensis* の感染に結びついているわけではないことを示す。関連して、本研究の結果は *L. londiniensis* が *N. fowleri*、*N. lovaniensis*、*N. australiensis* の株に対しては明らかに病原性であり、細胞内増殖性ならびに運動性の高さは病原性種の *L. pneumophila* と同等であることを示した。即ち、*L. londiniensis* も生理学的条件が整えばアメーバに対しては病原性種なのであるが、宿主によってはそれが整わず、あるいは抑制的な作用が生じる結果、同菌の感染が成立しないという見方もできる。種による感染性の違いに関しては、殺菌機構、細胞内の特定物質環境(エネルギー獲得手段)、またレセプターの存在も想定されており(Declerck、2007)、多方面の解析が必要で

ある。

E. 結論

非病原性の *L. londiniensis* は、環境中において *Acanthamoeba* 属アメーバではなく、*Naegleria* 属アメーバを宿主のひとつとして利用し、定着そして増殖を行っているものと考えられた。温泉等温水環境では *Naegleria* 属アメーバが高頻度、多量に検出されるが、このような微生物学的環境においては、*L. londiniensis* の宿主としてその汚染原因に主要な役割を果たしているものと考えられる。

F. 参考文献

Yagita K., Endo T. and De Jonckheere J.F. (1999) Clustering of *Acanthamoeba* isolates from human eye infections by means of mitochondrial DNA digestion patterns. *Parasitol Res* ,85:284-289.

Declerck P, Behets J, De Keersmaecker B, Ollevier F. (2007) Receptor-mediated uptake of *Legionella pneumophila* by *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *J Appl Microbiol*, 103:2697-703.

岡田美香、河野喜美子、倉 文明、前川純子、渡邊治雄、八木田健司、遠藤卓郎、鈴木 泉(2005)循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 I. 発生状況と環境調査、感染症学雑誌、79: 365-374.

八木田健司(2002) 温水環境における高温耐性アメーバ類の実態調査－温泉・公衆浴場、その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体 *Naegleria fowleri* の疫学と病原性発現に関する研究、厚生労働科学研究費補助金(生活安全総合研究事業、主任研究者 遠藤卓郎)「平成 13 年度分担報告書

G. 健康危惧情報

なし

H. 研究発表

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表-1、感染実験に用いた *Acanthamoeba* 株および *Naegleria* 株

Genus	Mt DNA RFLP type or Species	Strain	Remarks
<i>Acanthamoeba</i>	Ma	3E	AK*
		Oost	AK
		TJIA	AK
	JAC/E2	Davis	AK
		Val	AK
		Rot 5	AK
	13E	13E	AK
		24E	AK
		Ver	AK
	Castellani	Castellani	ATCC30011 (<i>A.castellanii</i>)
		JAC/E1	AK
		20E	AK
	BAR	BAR	AK
		Score	AK
		4E	AK
	JAC/E4	JAC/E4	AK
		L1a	Enviromental
		9E	AK
	Neff	Neff	ATCC30010 (<i>A.castellanii</i>)
		W. corn	AK
		SH197	Enviromental
	JAC/E5	Challel	AK
		JAC/E12	AK
1534/2	30E	AK	
	1501/3D	ATCC30873 (<i>A.polyphaga</i>)	
MDC	MDC	AK	
PD2	PD2	ATCC30841 (<i>A.lenticulata</i>)	
AA2	AA2	ATCC50238 (<i>A.divionensis</i>)	
76/2253	76/2253	Enviromental	
<i>Naegleria</i>	<i>N. fowleri</i>	KURUME	PAM**
		KUL	ATCC30808
		NF66	ATCC30214
	<i>N. lovaniensis</i>	TS	ATCC30569
		Aq/91/45D(Aq)	Enviromental
	<i>N. australiensis</i>	PP397	ATCC30958
	<i>N. jadini</i>	ITMAP(I-)400	ATCC30900
<i>N. gruberi</i>	EG	ATCC30133	

*AK: Amoebic Keratitis

**PAM: Primary Amoebic Meningoencephalitis