

【6】検査方法の集計

- 1 ゆうパックの到着までの期間 (n=30 機関)
 - 1 日後 (翌日) 2 7 機関
 - 2 日後 3 機関
- 2 ディスク到着後保存温度 (n=30 機関)
 - 80℃ 1 2 機関
 - 40℃ 7 機関
 - その他 1 9 機関
- 3 ディスク到着日から検査開始までの保存期間 (n=30 機関)
 - 1 日 (翌日) 7 機関
 - 1 9 日間 4 機関
 - 5 日、6 日間 各 3 機関
 - その他 (最長 2 4 日間) 1 3 機関
- 4 検水量 (n=30 機関)
 - 500ml 2 2 機関
 - 200ml 4 機関
 - 1000ml 2 機関
 - その他 2 機関
- 5 検水作製容器 (n=30 機関)
 - ガラス 1 5 機関
 - ポリプロピレン 8 機関
 - ポリプロピレン以外のプラスチック 7 機関
- 6 フィルター材質 (n=25 機関)
 - ポリカーボネート 1 1 機関
 - ニトロセルロース 1 0 機関
 - その他 4 機関
- 7 ホルダー素材 (n=26 機関)
 - ガラス 1 2 機関
 - ポリサルフォン 6 機関
 - その他のプラスチック 5 機関
 - ステンレス+ガラス 1 機関
- 8 フィルター ポアサイズ (n=24 機関)
 - 0.2 μ m フィルター 1 7 機関
 - 0.4 μ m フィルター 7 機関
- 9 フィルターからの回収方法 (n=10 機関)
 - フィルターを再浮遊液に入れボルテックスで 1 分間 剥離洗浄 7 機関
 - フィルターを再浮遊液に入れ手振り 10 分 1 機関
 - フィルターを再浮遊液に入れストマッカー処理 2 機関
- 1 0 冷却遠心法 (回転数・時間) (n= 7 機関)
 - 4350rpm (3000g)・30 分 1 機関

- | | |
|---------------------------------|-----|
| 6000rpm (3000g、6100g、6693g)・30分 | 3機関 |
| 6000rpm (5403g)・20分 | 1機関 |
| 7000rpm・30分 | 1機関 |
| 10000rpm・30分 | 1機関 |
- 1 1 冷却遠心後の上清の除去方法 (n=6 機関)
 デカンテーション 6機関
- 1 2 沈差の回収方法
 遠心後再浮遊液を加えピペッティング5回、デカンテーション 1機関
 遠心後再浮遊液を加えボルテックス 5機関
- 1 3 濃縮倍率 (n=30 機関)
 100倍 2.5機関
 50倍 3機関
 200倍 2機関
- 1 4 再浮遊量 (n=30 機関)
 5ml 1.9機関
 2ml 4機関
 1.0ml 4機関
 1ml、4ml、1.5ml 各1機関
- 1 5 加熱処理 (n=7 機関)
 加熱時間 20分6機関、30分1機関
 加熱温度 50℃7機関
- 1 6 酸処理 (n=17 機関)
 4分、5分 各5機関
 1.5分、2.0分 各2機関
 3～5分、7分、1.4分 各1機関
 処理液 自家製 9機関、購入品 8機関
- 1 7 培地
 WYO α 1.0機関
 GVPC 1.0機関
 MWY 3機関
 BCYE α GVPC 2機関
 BCYE α MWY 1機関

【7】まとめ

- 今回のレジオネラ属菌検査結果の集計は、HPAの方法を参考に、検査結果の中央値と6から94%の範囲を「良好範囲」として示しました。
- 加熱処理をした場合、回収率が低く出る傾向が認められた影響もあり、全体的に回収率は低い結果となりましたが、昨年度の回収率は、良好なものろ過法・酸処理で69.9% (n=10)、最も悪かった遠心法・加熱で9.1% (n=10) でした。(試料濃度は、今回と同様の10⁴CFU/ディスク)
- 回収率は、試料の保存期間や保存温度等による影響は認められませんでした。

- 全体としては遠心法とろ過法の回収率は同程度であり、加熱処理より酸処理の方が高い回収率を示しましたが、酸処理方法が実際の検体でも高い回収率を示すかについては検討が必要と考えられます。
- 19年度から20年度にかけて、一部の検査工程を指定して5機関で2回の外部精度管理を行ったところ回収率が試料1では0%から17.7%へ、試料2では、14.1%から19.7%に改善が認められたので、その濃縮方法を次に示します。この他にも工程の改善により回収率の向上が期待できると考えています。
- また、外部精度管理システムの構築に向けて改善を進め、実用化の方向性を探っていきたいと思います。

回収率を改善するためのポイント（濃縮法）の例をあげました。

培養検査のポイントは、濃縮後、菌の再回収を効率よく行うことにかかっています。

ろ過法

- ろ過ホルダーにフィルターが適切にセットできますか。
できればフィルターは、ポリカーボネート製でポアサイズ 0.2 μ m を使用してください。
回収率がニトロセルロース製フィルターの3倍位高くなるとの報告があります。
今回の結果でも回収率は0.2 μ m フィルターを使用した酸処理で比較すると、
試料1 ポリカーボネート製 38.6% (n=5)、ニトロセルロース製 8.9% (n=8)
試料2 ポリカーボネート製 39.3% (n=5)、ニトロセルロース製 14.0% (n=8) となっています。
- 検水ろ過後、検水容器に滅菌蒸留水などを入れて、キャップを強く閉めた後、よく振り容器の内壁を洗い、洗浄液もろ過する。この操作を2回繰り返す。
- ろ過ホルダーにはピペットで勢いよく滅菌蒸留水をかけて洗い、一緒にろ過する。
- フィルターのろ過部分に触れないようピンセットで注意深くフィルターを外し、5mlの滅菌蒸留水に浸し、1分間ボルテックスをかけ再浮遊させる。
今回の回答の中には、1分間ボルテックスをかけ再浮遊させる代わりにストマッカーを利用している機関も2カ所ありました。

遠心法

- 冷却遠心機の点検を行っていますか。
- 遠心終了直後に静かに遠心管を取り出し、ピペットで静かに上清を取り除く。
- 遠心管に滅菌蒸留水を1ml加え、ピペッティングを繰り返し、管壁をよく洗う。
さらに1mlを加え、さらに管壁をピペッティング操作で50回以上繰り返し洗い、沈渣を別の容器に移す。

平成 21 年度分担研究報告書

日本の環境水から分離される既存の DNA-DNA ハイブリダイゼーションキットにないレジオネラ属菌種の同定

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

市販の DNA-DNA ハイブリダイゼーション(DDH)キットにて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、塩基配列決定法にて同定された環境水から分離されたレジオネラ属菌の株数を増やし、DDH 法での同定結果と比較し検査精度の向上をはかった。昨年報告した *L.busanensis*、*L. gresilensis*、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii* の 5 菌種と新たに *L. geestiana* を追加した。この方法を用いて、日本の環境水から分離されたが、塩基配列決定法でも、同定不能であったレジオネラ属菌株の菌種同定が明確にできるようになった。

A. 研究目的

レジオネラ属菌は、自然界に広く分布する環境細菌である。土壌や沼地や、温泉地の冷却塔、室内加湿器、給湯設備、循環式浴槽や、温泉水などから分離されている。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。そこで、臨床診断を行うためには、迅速で簡便、正確な菌種同定が必要である。レジオネラ属菌は、約 50 種が報告されていて、市販の 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、基準株が固相されている 25 種の同定は可能である。しかし、温泉や公衆浴場などの浴槽水から *Legionella londiniensis*、*L. nautarum* 等が、検出される場合がある。このような場合には、市販キットでは、基準株が固相されていないため、同定不能となる。そこで、塩

基配列決定法を用いて同定を試みるが、代用する 16S rRNA 遺伝子の DNA 塩基配列決定法では、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、市販のキットに固相されていないレジオネラ属菌種の同定可能な DDH 法プレートを作成し、DDH 法により、より多くのレジオネラ属菌の同定を可能とする事を目的とした。昨年度までに基準株 DNA のプレートへの固定方法について検討し、基準株 DNA 固定プレートの作製を可能にし、*L.busanensis*、*L. gresilensis*、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii* の 5 菌種の DDH 法による同定が、可能になったと報告した。今年度は、塩基配列決定法で、同定したこれらのレジオネラ属菌、あるいは、未確定である環境分離株数を増やし、DDH 法での同定と検査精度の向上をはかった。また、*L. geestiana* を追加し、同様の検討を行った。

B. 研究材料と研究方法

1、使用菌：レジオネラ属菌の基準株で、*L. busanensis* ATCC BAA-518、*L. gresilensis* ATCC 700509、*L. londiniensis* ATCC700510(SG2)、*L. nautarum* ATCC49506、*L. quinlivanii* ATCC 43830 (SG1)、*L. geestiana* ATCC49504の6菌種6株を用いた。また、既に、16S rRNA 遺伝子の DNA 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13株と16S rRNA 遺伝子の DNA 塩基配列決定法にて同定できなかった環境分離菌11株を用いた。

2、基準株 DNA の準備：BCYE α 培地にて35°C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°C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°Cで1晩放置し、固定させた。溶液を廃棄後、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°C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°C2時間プレハイブリダイゼーションを行った。溶液を廃棄後、50°C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、被検菌：国立感染症研究所細菌第一部のレジオネラレファレンスセンターに過去に集められ、保存されたレジオネラ属菌を用いた。BCYE α 培地に継代し、35°Cで4日間培養したレジオネラ属菌を被検菌とした。

5、DDH法：被検菌よりDNAを抽出・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°Cで1時間30分ハイブリダイゼ

ーションを行った。1 \times SSCで3回洗浄後、発色酵素100 μ lを加え、37°C10分間放置した。その後、1 \times SSC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能とした。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。

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間の相対類似度

市販DDHキットで同定できない*L. busanensis*、*L. gresilensis*、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii*、*L. geestiana*の6菌種6株を被験菌としてDDH法を実施した。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630nmの吸光度を測定し、相対類似度を計算した。*L. busanensis*と*L. gresilensis*は、50%の相対類似度を持っていたが、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii*、*L. geestiana*はそれぞれ30%以下の相対類似度であり、判定基準に照らし合わせると、各々の菌種の同定が可能であった(表1)。

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レジオネラ属菌の同定試験

L. busanensis、*L. gresilensis*、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii*、*L. geestiana*の6菌種6株を固相させた自家製プレートと市販DDHキット内の25菌種同定可能プレートとの組み合わせによるDDH試験例を図1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%以下という判定基準を満たし、肉眼的にみても菌種同定が可能であった。

3、市販の DDH レジオネラ属菌用キットでは同定不能であったレジオネラ属菌の自家製プレートを用いた DDH 法による同定

市販の DDH キットでは同定不能で、塩基配列決定法でも同定不能であった環境分離菌 11 株の自家製プレートを用いた DDH 法の結果は、*L. busanensis* 6 株、*L. gresilensis* 1 株、*L. quinlivanii* 1 株、同定不能 3 株であった (表 2、図 2)。環境分離菌 11 株の各菌株の DDH 同定結果と塩基配列決定法の結果を表 3 に示した。複数菌種名に一致率が高く、同定不能とされた株であっても DDH 法では明確に同定された。一致率が比較的低かった 3 株は、DDH 法でも同定不能という結果であった。また、市販の DDH キットでは同定不能で、16S rRNA 遺伝子の DNA 塩基配列決定法では同定可能であった環境分離菌 13 株について、自家製プレートを用いて DDH 法を行った結果は、*L. londiniensis* 11 株、*L. nautarum* 2 株と同定された (表 2、図 3)。

D. 考察

レジオネラ属菌は、50 菌種が報告され、既に 25 菌種を簡便に同定可能な DDH 法によるレジオネラ属同定キットが市販され、一般的に使われている。しかし DDH 法は、簡便迅速であるが、菌量を多めに取るとキットに含まれている DNA 抽出試薬中のフェノールだけでは除タンパクができない。また、エタノール沈殿後の再エタノール洗浄操作を丁寧にしないとバックグラウンドが高くなったり、DNA を流出させてしまい、発色しなくて判定不能となる場合があるので、ある程度の修練を積む必要がある。しかし、DDH 法は、一度に沢山の菌種を簡単に同定する標準的な方法として、一般の検査室でも利用できる有益な方法である。

レジオネラ属は、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、buffered charcoal yeast extract (BCYE α) 寒天培地という 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寒天培地を用いる。この BCYE α 培地を用いて 36°C、3-7 日間培養すると灰白色、光輝性、凸状、正円のコロニーが形成される。生化学的検査法

で陽性となる項目が少ないため、生化学的性状による菌種名の同定が難しい。そのため、研究室等では、16S rRNA 遺伝子の DNA 塩基配列に基づく菌種の同定が行われている。しかし、被検菌の DNA 塩基配列が、標準菌種の基準株の塩基配列と完全に一致しない場合も少なからずあり、しかも、作業過程が多く、煩雑でコストがかかるため、一般の病院等の検査室では、塩基配列決定法による同定は難しい。レジオネラ菌種の同定を簡便にする DDH 法のキット (極東製薬工業) が市販されている。ところが、固相されている基準株は 25 菌種しかない。そこで、昨年度は、既存の DDH キットでは同定できない *L. busanensis*、*L. gresilensis*、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii* の基準株を DDH 法プレートに固着させて、更に 5 菌種の同定が可能になったと報告した。今年度は、更に *L. geestiana* を追加した。また、環境分離菌株の塩基配列決定法を用いて菌種を決定したり、決定できなかった環境分離菌株について DDH 試験を実施し、その信頼性を確認した。また、16S rRNA 遺伝子の DNA 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。

塩基配列決定法と DDH 法の両法でも同定できないレジオネラ属菌が 3 株あった。この 3 株は、新種のレジオネラ属菌株である可能性もある。更に 16S-rRNA ではなく *mip* 等の別の遺伝子の塩基配列を調べて検討する必要があるであろう。

市販プレートと自家製プレートを用いて、研究所保存の環境分離レジオネラ属菌株数を増やして 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

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. gresilensis*、*L. londiniensis*、*L.*

nautarum、*L. quinlivanii*、*L. geestiana* の6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 identification of *Legionella* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9:213-217.
- 4) Kusunoki, S., Ezaki, T., Tamesada, M., Hatanaka, Y., Asano, K., Hashimoto, 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.

5) 山崎利雄, 中村玲子, 1993、マイクロプレートハイブリダイゼーション法による抗酸菌同定法の検討, *結核*, 68:5-11

G. 研究発表

1. 論文発表

烏谷竜哉, 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

1) 山崎利雄、前川純子、杉山寛治、渡辺祐子、鈴木敦子、市瀬正之、倉文明、DNA-DNA ハイブリダイゼーション法によるレジオネラ属菌の同定、第58回日本感染症学会東日本地方学術集会、2009年10月、東京

2) 山崎利雄、前川純子、杉山寛治、渡辺祐子、鈴木敦子、市瀬正之、倉文明、市販DNA-DNAハイブリダイゼーション(DDH)法キットで同定できないレジオネラ属菌の同定、第83回日本細菌学会総会、2010年3月、横浜

H. 知的所有権の取得状況

なし

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. gresilensis</i>	<i>L. londiniensis</i>	<i>L. nautarum</i>	<i>L. quinlivanii</i>	<i>L. geestiana</i>
<i>L. busanensis</i>	100	49	-	-	-	-
<i>L. gresilensis</i>	50	100	-	-	-	-
<i>L. londiniensis</i>	-	-	100	-	-	-
<i>L. nautarum</i>	-	-	-	100	-	-
<i>L. quinlivanii</i>	-	-	-	-	100	-
<i>L. geestiana</i>	-	-	-	-	-	100

- : 30%以下

表2 環境分離株の16S-rDNA塩基配列決定法とDDH法による同定結果の比較

塩基配列決定法	菌株数	DDH法による同定名	株数
同定不能	11株	<i>L. busanensis</i>	6株
		<i>L. gresilensis</i>	1株
		<i>L. quinlivanii</i>	1株
		同定不能	3株
同定可能	13株	<i>L. londiniensis</i>	11株
		<i>L. nautarum</i>	2株

表3 塩基配列決定法で同定不能と判定されたレジオネラ環境分離菌11株のDDH同定結果

NIIB No.	DDH法	16S-rDNAのDNA塩基配列による同定結果
1	958	<i>L. busanensis</i> <i>L. busanensis</i> 98% (457/465)、 <i>L. gresilensis</i> 97%(452/465)
2	1034	<i>L. busanensis</i> <i>L. busanensis</i> 99.8% (460/461)、 <i>L. gresilensis</i> 97% (447/461)
3	1222	<i>L. busanensis</i> <i>L. busanensis</i> 99.6% (466/468)、 <i>L. gresilensis</i> 97% (453/468)
4	1655	<i>L. busanensis</i> <i>L. busanensis</i> 99.8% (485/486)、 <i>L. gresilensis</i> 97% (468/482)
5	1906	<i>L. busanensis</i> <i>L. busanensis</i> 99.8% (464/465)、 <i>L. gresilensis</i> 97% (451/465)
6	1221	<i>L. busanensis</i> <i>L. busanensis</i> 98% (459/468)、 <i>L. gresilensis</i> 97% (454/468)
7	1713	<i>L. gresilensis</i> <i>L. busanensis</i> 97% (461/471)、 <i>L. gresilensis</i> 96% (458/473)
8	1220	<i>L. quinlivanii</i> <i>L. dresdenensis</i> 97% (452/468)、 <i>L. jordanis</i> 96% (447/468) *
9	1169	同定不能 <i>L. nautarum</i> 99% (482/487)、 <i>L. feeleii</i> 95%(465/487)
10	326	同定不能 <i>L. pneumophila</i> 96% (461/481)、 <i>L. gormanii</i> 96% (455/474)
11	333	同定不能 <i>L. wadsworthii</i> 98% (461/481)、 <i>L. pneumophila</i> 97% (449/461)

* *mip* の塩基配列で *L. quinlivanii* 100% (550/550)、*L. gresilensis* 88% (496/564)

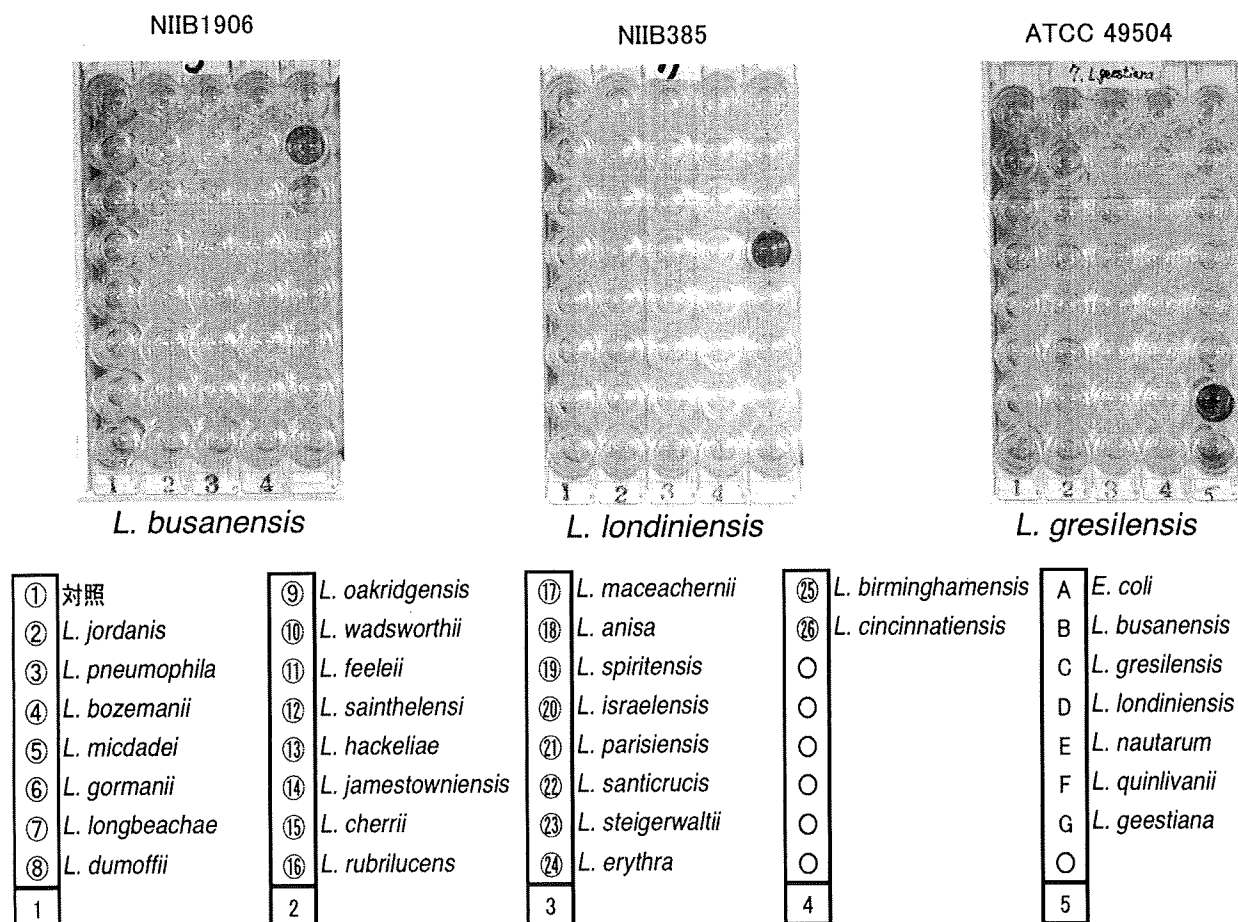


図1 レジオネラ属菌を用いたDDH法による同定試験

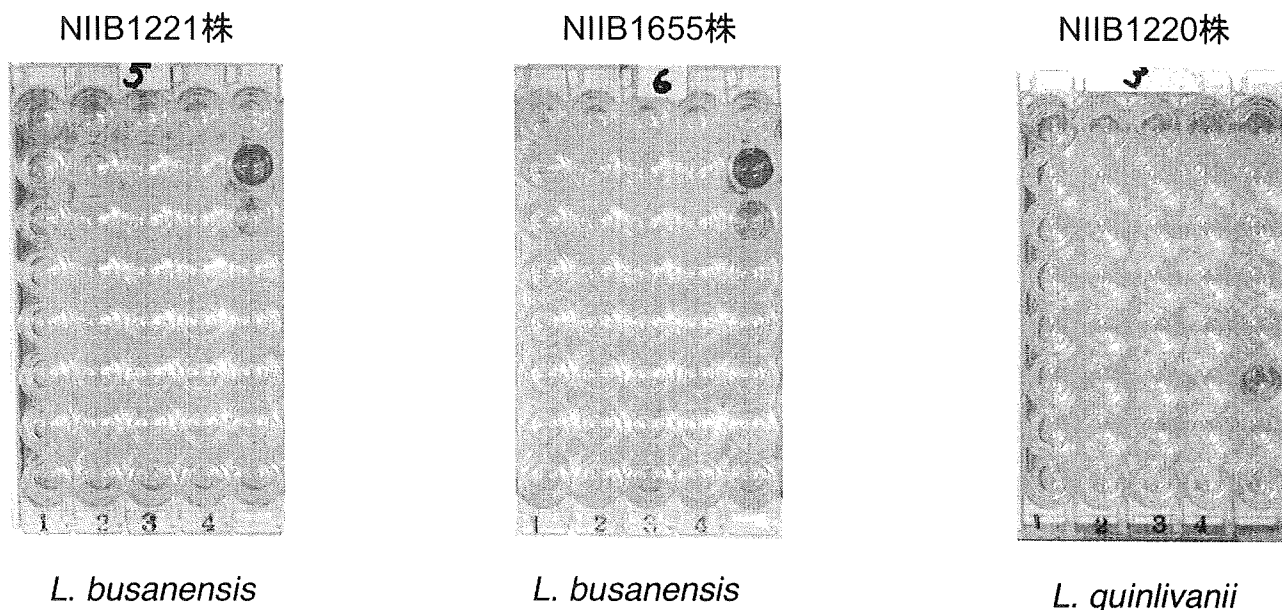


図2 16S rRNAの塩基配列で決定できなかつた臨床分離株のDDH法による同定

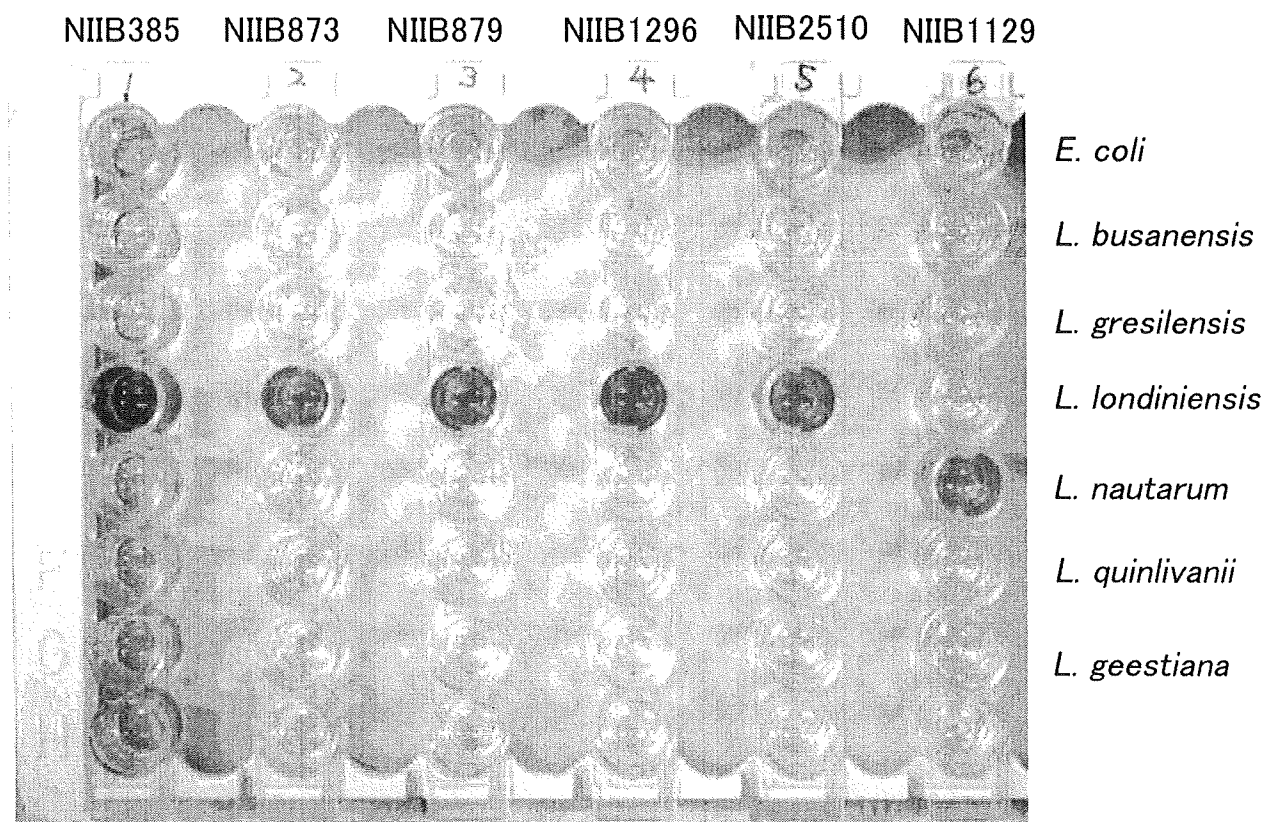


図3 環境分離株の自家製プレートを用いたDDH法同定結果

「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」

Legionella pneumophila の自由生活性アメーバ感染性における宿主特異性の問題

研究代表者 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者 八木田健司 国立感染症研究所 寄生動物部

研究要旨

冷却塔および浴槽水より分離された *Legionella pneumophila* (L.p)血清群(SG)1株ならびにアメーバ株を用いて、菌のアメーバ感染性あるいは細胞内増殖性と分離された環境条件(温度条件)との関係を検討した。環境中に生息するレジオネラ属菌の分布特性を規定する要因としては、菌の宿主アメーバ特異性がその主因となることを示す結果は得られず、菌の温度耐性能力も考慮する必要があるものと思われた。なお、アメーバ属によっては *Acanthamoeba* 属などは L.p SG1 に対する高い感受性を示し、L.p SG1 による環境汚染あるいは感染源成立を規定する生物学的要因となりうることが示唆された。

A. 目的

近年のレジオネラ属菌株に関する各種の分子生物学的解析から、レジオネラ属菌は冷却塔や浴槽等その生息する環境によって、菌種、血清型、遺伝子型また抗原型には分布に偏りが見られることが明らかになっている。例えば、冷却塔では *L. pneumophila* (L.p) の SG1 の割合が多いのに対し、浴槽水では L.p の他の血清型の割合が増す。この環境によるレジオネラ属菌の菌種、血清型、遺伝子型また抗原型の分布特性の違いが、ではどのような要因により規定されるのかは現在のところ十分解明されていないのが現状で、その解明は環境がレジオネラ感染源となる原因を理解し、対策に役立て

る上でも重要な研究と考えられる。

その要因としてはレジオネラ属菌と環境中の宿主アメーバとなる自由生活性アメーバに大別して考えることが理解しやすいと思われる。菌側に関しては細菌学的性質(温度等環境要因に対する耐性能力など)が問題となる。アメーバに関してはいわゆる宿主特異性がこの点に大きく関係すると考えられる。本研究では、冷却塔および浴槽水より分離された L.p SG1 株ならびにアメーバ株を用いて、菌のアメーバ感染性あるいは細胞内増殖性と分離された環境条件(温度条件)との関係について調べることで、アメーバ側の要因を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

1. レジオネラ属菌株

L. pneumophila SG1 として以下の菌株を用いた。

158 (浴槽水分離)

160 (浴槽水分離)

1052 (冷却塔分離)

1592 (冷却塔分離)

上記菌株は BCYE α 培地において 30°C および 37°C で 3 日間培養したものを実験に用いた。

2. アメーバ株

調べたレジオネラ属菌とは無関係に分離された *Acanthamoeba* 属、*Hartmannella* 属、*Vannella* 属、*Naegleria* 属、および *Vexillifera* 属の分離株を用いた(表-1)。

アメーバ分離株は大腸菌塗布寒天プレートにおいて 30°C および 37°C で培養した栄養体を実験に用いた。

3. 感染方法

3 日間培養したレジオネラ菌株をアメーバ用バッファー (NaCl 12.0g、MgSO₄ · 7H₂O 0.4g、CaCl₂ · 2H₂O 0.4g、Na₂PO₄ 14.2g、KH₂PO₄ 13.6g/1000ml を 100 倍希釈して調整) で濃度約 1.0 O.D. に調整した。加熱処理した大腸菌 (DH1) も同様に調整し、両菌浮遊液を等量で混合した。この菌液を 90mm 径の寒天プレート (1.5%) に約 0.5ml を全面に塗布し表面を乾燥させた。これをレジオネラ菌株 (培養温度の条件も含めて) ごとに作成し試験用培地とした。

アメーバは増殖中の栄養体をプレート上でアメーバ用バッファーで浮遊、回収し、500xg、

5 分間の遠心で濃縮後、レジオネラ属菌を塗布したプレートに 3 μ l を滴下し乾燥させた。また同じアメーバ濃縮液は大腸菌のみを塗布した寒天プレート (菌量として 1.0 O.D. を 0.5ml 塗布) に同様に 3 μ l 滴下し、アメーバの正常な増殖を観察した (対照実験)。

感染時の温度条件は菌株およびアメーバ株の事前の培養温度に合わせた。即ち、30°C で培養した菌株およびアメーバ株の感染は 30°C で行うという条件とした。

4. 感染性の評価

感染性の有無は感染 2 日後において試験用培地上で顕微鏡的に観察されるアメーバの変化 (細胞の崩壊、細胞内で運動する菌の確認)、また対照となる大腸菌塗布寒天培地上で観察される正常なアメーバ増殖との比較 (アメーバ増殖によるプラーク領域の大きさの比較) で評価した。なおアメーバ増殖性の差を表すために、本実験ではプラーク領域の大きさから以下のようなスコアを設定した。増殖性の高い順から、対象実験と同程度の増殖を示す場合を ++、対象の約 50% の増殖を示す場合を +、増殖せずに滴下した領域に止まる場合を \pm 、滴下領域内で死滅した場合を - とした。また必要に応じて試験用培地よりアメーバを回収しギムザ染色を行い、アメーバ細胞内での菌の増殖を調べた。

C. 研究結果

以下、調べたアメーバ属ごとに結果をまとめる。

1. *Acanthamoeba* 属 (表-2)

冷却塔分離の 9 株および浴槽水分離の 6 株を調べた。各アメーバ株は対象実験の大腸

菌塗布培地上では滴下後の増殖は良好で、2日後には滴下した領域よりもさらに外側に栄養体の活発な増殖が観察され、プラーク領域は拡大していた(図-1)。一方、L.p を塗布した試験用培地上では温度 30°Cの条件で、滴下後1日程度は滴下した領域内に栄養体が観察され、また一部のアメーバはその領域よりも外側へと移動していく様子が観察されたが、2日後にはほとんどのアメーバは死滅し、滴下した領域外へと移動していたアメーバも菌の細胞内増殖による崩壊で死滅しておりプラークの拡大は認められなかった。37°Cでもほぼ同様の結果であった。結果としては、*Acanthamoeba* 属においては分離された環境の違いに関わらず、アメーバ株はすべての菌株において高い感染性を示した。

2. *Hartmannella* 属(表-3)

冷却塔分離の1株および浴槽水分離の4株を調べた。冷却塔分離株は培養温度条件が同じであれば菌株による感染性には大差がなく、温度 30°Cではアメーバの増殖が滴下領域内に抑制され、温度 37°Cでは対照の50%程度の増殖を示した。増殖が抑制傾向にあった30°Cでは感染したアメーバ数の割合が10%前後あり、浴槽水分離のL.p#160に対しては34%の感染率がみられた。しかし菌の細胞内増殖の進行度は比較的遅く(図-2)、一方、37°Cでは全体的に感染率の低下が示された。

浴槽水分離株の感染性はアメーバ株および菌株によっても異なった。増殖性は対照の50%程度から滴下領域内に抑制されるまで株による差がみられ、温度 30°Cの方が37°Cよりも増殖抑制が強く表れることは冷却塔分離株の場合と同様であり、37°Cでは対照実験と変わらない増殖性も示された。また感染アメーバ

数の割合をみると30°Cでもその割合は数%に止まり、37°Cでは感染アメーバは検出されなかった点で冷却塔分離株との違いがみられた。

3. *Naegleria* 属(表-4)

冷却塔分離株のみ6株を調べた。温度30°Cでの増殖性は5株ですべての菌株の場合で滴下領域内に抑制され、1株のみ領域外への増殖がみられたが同株の領域内に残るアメーバでは菌の細胞内増殖による死滅が認められた。結果としては*Acanthamoeba* 属の場合とほぼ同様の傾向にあった。37°Cでは6株中3株は対照実験でも死滅したため菌の感染性は不明で、残り3株はどの菌株に対しても滴下領域内での死滅が観察された。

4. *Vannella* 属および *Vexillifera* 属(表-5)

Vannella 属では冷却塔分離ならびに浴槽水分離の各1株づつを調べた。冷却塔株は形態的に小型のアメーバで、30°Cでは*Acanthamoeba* 属と同様な結果を示し、感染後2日でアメーバの死滅が観察された。また37°Cでは対照実験でも増殖せず死滅した。一方、浴槽水株は大型のアメーバで、30°Cおよび37°Cとも浴槽水分離の*Hartmannella* 属と同様な結果を示した。

Vexillifera 属は冷却塔分離株1株を調べた。ほぼ*Acanthamoeba* と同程度の大きさの株であったが、各菌株の試験用培地における30°Cおよび37°Cでの増殖性は対照実験と変わらず、活発な増殖がみられた。増殖する栄養体内にはレジオネラ属菌の増殖は認められず、試験培地上に塗布した大腸菌とともにレジオネラ属菌も消費されていた。

D. 考 察

英国の研究者 Rowbotham が 1980 年、自由生活性アメーバが環境中のレジオネラ菌の宿主となることを実験的に証明して以来、レジオネラ菌の宿主アメーバ特異性の問題はひとつの大きな課題となった (Rowbotham 1980)。

これまでにレジオネラ属菌としては 50 菌種が報告されているが、临床上重要なヒト感染例が知られる *L. pneumophila*、*L. dumoffii*、*L. longbeachae*、*L. bozemanii* などは我々のこれまでの研究で、同一宿主 (*Acanthamoeba*) に対して菌種による感染性の差があることを定量的に明らかにしている。また、ヒト感染性は有しないとされる *L. londinienis* に関しては、*Acanthamoeba* では増殖せず、高温耐性の *Naegleria* 属 (*N. fowleri* や *N. lovaniensis* 等) が宿主となるという特徴があることを明らかにしており、レジオネラ属菌における宿主アメーバ特異性の一端が明らかにされている。

一方、レジオネラ属菌の遺伝子型や抗原型が浴槽水型あるいは冷却塔水型という分布特性を示すことが近年明らかになっており、このような環境による菌の遺伝子型の偏りが宿主アメーバ特異性に影響されることは、大いに予想されることである。本研究では、環境を冷却塔 (30°C 前後) と浴槽 (40 度前後) に温度条件で大別し、そこで分離された *L. p* の SG1 と各種のアメーバとの間で感染実験を行うことで、環境により菌のアメーバ感染性に差がみられるかどうかを調べた。

結果としては、特定のアメーバがその環境 (温度) に生息するレジオネラ属菌の増殖に必須であると考えられる証拠は示されなかった。すべてのアメーバ属に関して、調べた種類お

よび株数を冷却塔と浴槽で合わせることはできなかったため、今後この条件を満たした形での評価が必要であろうが、本研究結果からはレジオネラ属菌の遺伝子型あるいは抗原型の分布特性は宿主アメーバのみならず、菌側の細菌学的性質、例えば菌の温度耐性能力が重要な因子として働いていることも考慮する必要があると考えられた。

本研究結果から宿主アメーバ特異性に関する知見を整理すると、まず調べたアメーバの中では *Acanthamoeba* 属は *L. p* の SG1 に最も感受性が高いと考えられ、様々な温度条件の環境において *L. p* の SG1 による汚染の重要な生物学的要因となりうることが示された。

L. p の SG1 が临床上最も重要であることを考えると、*Acanthamoeba* 属の水あるいは土壌も含めて、その環境中の生息状況と *L. p* のヒト感染の関連性が問題となることが考えられた。即ち、*Acanthamoeba* による汚染が一義的に *L. p* の SG1 汚染に結びつく可能性である。シスト化能力を備えた *Acanthamoeba* 属の環境適応能力の高さには注意が必要で、新たに *L. p* の SG1 汚染がみられるようになった環境では、*Acanthamoeba* 属の汚染を調査すべきものと考えられる。同様のことは *Naegleria* 属にも言えるかもしれないが、本研究では調べたアメーバ株が冷却塔分離に偏っているため、浴槽水分離株の評価が今後の課題である。

Hartmannella 属は冷却塔あるいは浴槽水中に *Acanthamoeba* よりも多く検出される最も一般的なアメーバであり、上記 2 属のアメーバと比較して *L. p* の SG1 の好適な宿主とはなりにくいことが示唆された。これはアメーバ属間における細胞内増殖性の差だけの問題かもしれないが、感染源へと進む急激な *L. p* SG1 汚染への *Hartmannella* の関与は低いものと

考えられる。

Vannella 属および *Vexillifera* 属に関しては、レジオネラ属菌の宿主となるという報告はこれまで冷却塔分離の株が *L.p* の SG1 に対し抵抗性であったという報告に限られ (Rowbotham 1986)、実験的な感染性は不明である。本研究でも調べた株が少ないので傾向は明らかではないが、*Vannella* 属の中には宿主となるアメーバが存在するという結果は、シスト化しないアメーバがレジオネラ属菌の宿主となる意味で重要である。即ち、シスト化する *Acanthamoeba* 等はシストになるとレジオネラ感染が不可能となるため、増殖装置として機能しないのに対し、シスト化しないアメーバは常時レジオネラ感染の危険にさらされ、その増殖装置となってしまう点で宿主としての重要性が増すからである。一方で、対極的な結果を示したのが *Vexillifera* 属の冷却塔分離株で、本研究で調べたアメーバの中では明らかに *L.p* の SG1 非感受性であり、菌は細胞内に取り込まれると大腸菌と同様に消化され消費された。*Acanthamoeba* 属も 15~20℃では取り込んだレジオネラ属菌を消化する可能性があることが知られているが (Anand 1983)、30~37℃というレジオネラ属菌にとって最も増殖に好適な温度条件でありながら *Vexillifera* 属には菌に対する抵抗性が認められることは極めて興味深い結果である。本アメーバ属には特異的な抵抗メカニズムが存在することが想定され、その解明は今後の課題となりうると思われた。

E. 結論

環境中に生息するレジオネラ属菌の分布特性を規定する要因として、特定のアメーバがその環境に生息するレジオネラ属菌の増殖に必

須であるという明確な宿主特異性がその主因となるとは現在のところは想定されず、アメーバ側に要因を求めるとすれば、おそらくは感染性が異なるアメーバ種の生態学的な存在バランスがより重要であると考えられた。ヒトのレジオネラ感染を考える上では、*Acanthamoeba* 属は宿主アメーバとして最も重要と考えられ、環境の *Acanthamoeba* 汚染はレジオネラ対策上重要な意味をもつものと考えられた。

F. 参考文献

Rowbotham, T.J.(1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae, *J.Clin. Pathol.*, **33**, 1179-1183.

Anand, C.M., Skinner, A.R., Malic, A., and Kurtz, J.B.(1983) Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *J. Hyg. Camb.*, **91**, 167-178.

Rowbotham, T.J.(1986) Current views of the relationships between amoebae, Legionellae and man. *Israel J. Med. Sci.*, **22**, 678-689.

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表-1、調べた自由生活性アメーバの属名と株の分離ソース

アメーバ属	分離株	分離ソース
<i>Acanthamoeba</i>	AC/1764-3	冷却塔
	AC/1749-10	冷却塔
	AC/1779-4	冷却塔
	AC/1785-7	冷却塔
	AC/1812-19	冷却塔
	AC/1812-23	冷却塔
	AC/1812-26	冷却塔
	AC/1812-31	冷却塔
	AC/1812-39	冷却塔
	AC/G5	浴槽水
	AC/O7-6	浴槽水
	AC/O7-7	浴槽水
	AC/O7-8	浴槽水
	AC/T3	浴槽水
AC/T40	浴槽水	
<i>Hartmannella</i>	HT/1812-39	冷却塔
	HT/O10-8	浴槽水
	HT/O6-18	浴槽水
	HT/SHB	浴槽水
	HT/O7-4	浴槽水
<i>Naegleria</i>	NG/1885-4	冷却塔
	NG/1885-5	冷却塔
	NG/1895-3	冷却塔
	NG/1812-36	冷却塔
	NG/1864-4	冷却塔
	NG/1779-17	冷却塔
<i>Vannella</i>	VN/1812-37	冷却塔
	VN/O6-18	冷却塔
<i>Vexillifera</i>	VX/1812-37	浴槽水

表-2、*Acanthamoeba* 分離株のレジオネラ属菌 L.p.(SG1)株に対する増殖性および感染性

アメーバ株	分離ソース	レジオネラ L.p.(SG1) 30℃培養				レジオネラ L.p.(SG1) 37℃培養			
		#158	#160	#1052	#1592	#158	#160	#1052	#1592
AC/1764-3	冷却塔	—	—	—	—	—	—	—	—
AC/1749-10	冷却塔	—	—	—	—	—	—	—	—
AC/1779-4	冷却塔	—	—	—	—	—	—	—	—
AC/1785-7	冷却塔	—	—	—	—	—	—	—	—
AC/1812-19	冷却塔	—	—	—	—	—	—	—	—
AC/1812-23	冷却塔	—	—	—	—	—	—	—	—
AC/1812-26	冷却塔	—	—	—	—	—	—	—	—
AC/1812-31	冷却塔	—	—	—	—	—	—	—	—
AC/1812-39	冷却塔	—	—	—	—	—	—	—	—
AC/G5	浴槽水	—	—	—	—	—	—	—	—
AC/O7-6	浴槽水	—	—	—	—	—	—	—	—
AC/O7-7	浴槽水	—	—	—	—	—	—	—	—
AC/O7-8	浴槽水	—	—	—	—	—	—	—	—
AC/T3	浴槽水	—	—	—	—	—	—	—	—
AC/T40	浴槽水	—	—	—	—	—	—	—	—

アメーバの増殖性スコア：増殖性の高い順から

++：対象実験と同程度の増殖を示した場合

＋：対象実験の約 50%の増殖を示した場合

±：増殖せずに滴下した領域に止まった場合

－：滴下領域内で死滅した場合

感染 2 日後の観察で評価した

なお対照実験は大腸菌のみを塗布した寒天プレート上での増殖

表-3、*Hartmannella* 分離株のレジオネラ属菌 L.p.(SG1)株に対する増殖性および感染性

アメーバ株	分離ソース	レジオネラ L.p.(SG1) 30℃培養				レジオネラ L.p.(SG1) 37℃培養			
		#158	#160	#1052	#1592	#158	#160	#1052	#1592
HT/1812-39	冷却塔	±(9)	±(34)	±(19)	±(11)	+(2)	+(14)	+(3)	+(0)
HT/O10-8	浴槽水	±(0)	±(0)	±(0)	+(0)	+(0)	+(0)	+(0)	+(0)
HT/O6-18	浴槽水	+(0)	±(3)	+(0)	+(0)	++(0)	+(0)	++(0)	++(0)
HT/SHB	浴槽水	+(2)	±(3)	±(1)	±(4)	+(0)	+(0)	+(0)	+(0)
HT/O7-4	浴槽水	+(0)	±(0)	+(0)	+(0)	++(0)	+(0)	+(0)	++(0)

()内数字は細胞内増殖がみられた感染アメーバ数の割合%

表-4、*Naegleria* 分離株のレジオネラ属菌 L.p.(SG1)株に対する増殖性および感染性

アメーバ株	分離ソース	レジオネラ L.p.(SG1) 30℃培養				レジオネラ L.p.(SG1) 37℃培養			
		#158	#160	#1052	#1592	#158	#160	#1052	#1592
NG/1885-4	冷却塔	—	—	—	—	—	—	—	—
NG/1885-5	冷却塔	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND
NG/1895-3	冷却塔	—	±	±	±	—	—	—	—
NG/1812-36	冷却塔	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND
NG/1864-4	冷却塔	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND
NG/1779-17	冷却塔	—	±	—	—	—	—	—	—

NDは対照実験でも増殖しないので実験を実施せず

表-5、*Vannella* および *Vexillifera* 分離株のレジオネラ属菌 L.p.(SG1)株に対する増殖性および感染性

アメーバ株	分離ソース	レジオネラ L.p.(SG1) 30℃培養				レジオネラ L.p.(SG1) 37℃培養			
		#158	#160	#1052	#1592	#158	#160	#1052	#1592
VN/1812-37	冷却塔	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND
VN/O6-18	冷却塔	+	±	±	±	++	+	+	++
VX/1812-37	浴槽水	++	++	++	++	++	++	++	++

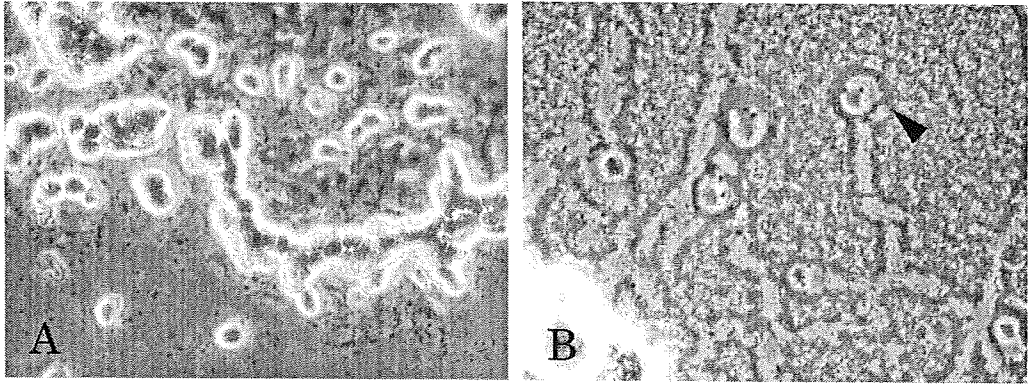


図-1、*Acanthamoeba* 属分離株(AC/1764-3)の増殖性

- A. 対照実験の大腸菌塗布培地上における増殖。滴下領域(写真上部)より外側へと増殖が進み、2日後には多数の栄養体が観察された。
- B. レジオネラ L.p.(#158)を塗布した試験用培地上における増殖。滴下後しばらくは滴下領域(写真左下部)より外にも進行するが、2日後には菌の細胞内増殖により崩壊、死滅した(▲)。

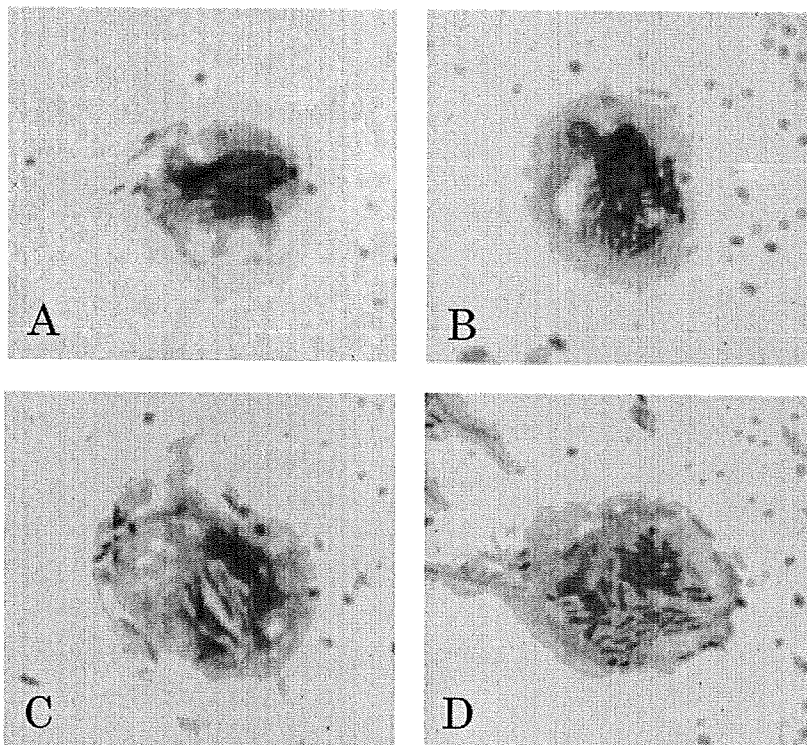


図-2、*Hartmannella* 属分離株(AC/1812-39)におけるL.p.株の細胞内増殖(30°C)

- A. #158 (浴槽水分離)、 B. #160 (浴槽水分離)、
 C. #1052 (冷却塔分離)、 D. #1592 (冷却塔分離)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表