

研究分担者 国立感染症研究所 寄生動物部 八木田健司

研究協力者 国立感染症研究所 寄生動物部 泉山信司

## レジオネラ属菌遺伝子型とアメーバ適合性

**研究要旨:** *L. pneumophila* 分離株と自由生活性アメーバを用いて実験感染を行い、菌の遺伝子型グループとアメーバの適合性を調べた。*L. pneumophila* は冷却塔、土壌や臨床検体由来の C1、C2、S1 グループについて、アメーバは浴槽より分離した *Acanthamoeba* sp.、*Naegleria* sp.、*Vannella* sp. および *Vexillifera* sp. を試験した。*Acanthamoeba* はすべてのグループの菌に感染したが、*Naegleria* sp. および *Vannella* sp. は株により菌グループの感染性に違いを示し、菌の遺伝子型グループ（亜種レベル）による宿主アメーバ適合性が異なることが示された。これらの結果は野外におけるレジオネラ属菌の分布、生態の決定要因に環境中のアメーバ相が関与していることを示唆するものであった。なお *Vexillifera* sp. はアメーバの中でもレジオネラ耐性的な性質を示し、野外環境において宿主とならないアメーバの存在の重要性を示唆した。

### A. 研究目的

環境中に生息する *Acanthamoeba* 等の自由生活性アメーバは、レジオネラ属菌の自然宿主として知られている。公衆衛生的には宿主アメーバ類の生態がレジオネラ感染症の成立に大きく影響を及ぼしており、生活環境中における宿主アメーバ調査とその管理は重要な問題である。最近の研究から、レジオネラ属菌の遺伝子型が分離される環境によりその分布に違いが見られることが明らかになってきている。その遺伝子型の分布に宿主アメーバが関連している可能性に関して、前年度 *Vannella* において菌の特定遺伝子型と関連していることを示唆する結果が得られた。本研究では引き続きアメーバ類と *L. pneumophila* の実験的感染から菌の遺伝子型と宿主となるアメーバの適合関係を調べた。

### B. 研究方法

#### 1. レジオネラ属菌株

*L. pneumophila* の遺伝子型に基づくグループとして亜種 *pneumophila* の C1 グループ（冷却塔分

離株）、亜種 *fraseri* の C2 グループ（冷却塔、浴槽および喀たん分離株）および S1 グループ（土壌、喀たん分離株）、さらに亜種 *pascullei*（シャワー、給水系分離株）を用いた。また *L. pneumophila* SG1 の対照株として 2 つの患者由来株を用いた。菌株は BCYE 培地にて 30、3 日間培養し実験に供した。

#### 2. アメーバ株

浴槽水より分離した *Acanthamoeba* sp. (AC)、*Vannella* sp. (VN)、*Naegleria* sp. (NG) ならびに *Vexillifera* sp. (VX) を用いた。これらのアメーバ類は大腸菌塗布培地を用いて 30 で培養し、栄養体を回収した。

#### 3. 感染実験

前年度と同様で、培養した *L. p* 菌株をアメーバ用生理食塩水 (AS) で希釈し濃度約 0.1 OD の菌液を調整した。加熱により不活化処理した大腸菌を用いて同様に菌液を調整し、2 つの菌液を等量混合した。無栄養寒天培地に約 0.5ml の混合菌液を塗布し風乾させ試験培地とした。供試するアメーバ

については増殖中の栄養体を培地上より回収し、AS で浮遊液を調整した。レジオネラ属菌を塗布した試験培地上に供試アメーバ浮遊液を滴下し風乾させ、アメーバと菌を接触させた。大腸菌のみを塗布した培地を用い同様にアメーバ浮遊液を滴下し、これを対照実験とした。30 で行い菌の感染を生き残った栄養体の有無で評価した。評価に際してのスコアは以下のようにした。(+)は栄養体の増殖が認められ、また菌の細胞内増殖による破壊が認められない、菌の感染は成立しなかった状態。(±)は栄養体の増殖が認められるも、一部で菌の感染があり細胞内増殖による破壊が認められる。(-)は菌の感染後細胞内増殖により破壊され、栄養体の増殖が認められない、死滅状態とした。

### C. 研究結果

表-1 に遺伝型グループ分類に基づく菌株とアメーバ感染の関係を一括して示した。また図-1 には代表的なアメーバの菌感染性を示した。

まず *L. pneumophila* SG1 株であるフィラデルフィア株(標準株)と国内患者株に関しては、同一血清型でありながら両極的な結果を示した。国内患者株は一部のVNとVXを除きすべてのアメーバに感染し、アメーバは死滅した。一方フィラデルフィア株ではすべてのアメーバが非感染で、アメーバは対照実験の大腸菌培養と同様の増殖性を示した。

*fraseri* C1 グループは血清型として OLDA と Oxford の株を含んでいたが、これらはACにはいずれも感染し、NG にはほぼすべてに感染したが、VN では株によって、また菌株(血清型の違い)によって感染性が異なった。VN の中でC1に非感染性のもも存在したが、これは *L. pneumophila* SG1 対照株に対しても非感染性を示した株であった。VX はC1に対して非感染性であった。

*fraseri* C2 グループは血清型として Oxford、SG1 および SG5 を含んでいたが、感染性はアメーバ株による違いが比較的明確であった。AC はすべて感染し、NG は菌株によらず感染性、非感染性に分かれる傾向が見られた。VN のすべての株およびVX はC2 *fraseri* に対しては非感染性であった。C2 *fraseri* の標準株(SG5)については、AC を含め調べたすべてのアメーバが非感染性であった。

*fraseri* S1 グループは血清型 *Philadeifia* と SG1 を含んでいたが、そのアメーバ感染性に関してはC2と同様の結果であった。

別亜種の *pascullei* は血清型 SG5 で、シャワーから分離された標準株はACに対しても非感染性であり、NG の一部のみ感染性であった。また給水系分

離株はACの一部に感染性を示したが、NG および他のアメーバに対しては標準株とほぼ同様の結果を示した。

### D. 考察

レジオネラ属菌の遺伝子型が環境により検出頻度が異なることが明らかになっている。遺伝子型が菌の病原性を含めた細菌学的性質に影響を及ぼす因子となることを考えれば、特定の環境が感染源となる可能性についてそこに生息するアメーバが菌の宿主となりうるかどうか極めて重要な要因となる。これまでに、アメーバの中ではレジオネラ感染モデルとされる *Acanthamoeba* の場合はSG1を含め多くの血清型に広範に感染性を示すことが知られているが、今回注目した遺伝子型グループに対しても調べたAC株中での差はほとんど認められなかった。AC はいかなる環境でもそこにいる菌にとって格好の増殖装置として存在すると考えられる。例外的に標準株である *Philadeifia* 株(SG1)とC2 *fraseri* の標準株(SG5)がAC感染性を示さなかったが、これは両者とも実験室内株として人工培養された期間が長く、アメーバ感染性に変異が生じたためではないかと想定される。

全般的にみると、環境中のアメーバの中ではNGとVNが菌の遺伝型グループとの間で適合性といえる関係があるのではないかと、という結果が示された。前年度、今回調べたVNとは異なるが、それらの中でC1グループの *fraseri* に対しての感染性の差が認められていたが、*L. p* SG1の特定のグループの菌の分布、生態に環境中のアメーバが関与していることを示唆する結果である。菌のグループは亜種としての分類と相関するので、菌の亜種レベルで適合性が変わるということが想定される。

菌とアメーバの適合性を決定する要因に関しては、アメーバ側、菌側それぞれが有するのと想像される。感染から細胞内増殖までの過程を考えると、接着、細胞内取り込み、食胞内消化耐性、菌の増殖性など多くのプロセスが関与しており、それぞれのプロセスで各アメーバ種また株に特有の性質が発揮されるものと思われる。同属アメーバ内で菌グループによる感染性が異なるので、ゲノムレベルの比較解析が有用な研究課題になるものと思われる。

実際の野外環境においては、実験的に用いる単純なアメーバ相とは異なり、宿主となり得るもの、逆にならないもの(捕食するものかもしれない)が重層、多層的に存在することで、そのアメーバに基づく環境によって決定されるレジオネラ環境が生ずるので

はないかと考えられる。中でも興味深いのはレジオネラ耐性とも呼ぶべき性質を示すアメーバの存在で、特に Vexillifera (VX) は他のアメーバにはすべて感染する SG1 患者株でも増殖は対照と変わらない点である。本アメーバは環境中の自由生活性アメーバの中では最も小型でシスト化をしないという特徴がある。検出率は比較的高く、大腸菌培養での増殖性は高い。本アメーバに関してはほとんど生物学的な研究がなされておらず、野外環境でどの程度レジオネラ汚染に抑制的に働くかは不明である。レジオネラに関連したアメーバ研究としては、従来中心とされてきた宿主アメーバの視点、研究とともに、今後はレジオネラ耐性的な Vexillifera や Vannella の研究も重要性を増すものと思われ、その抑制メカニズムを解明することは生物学的にレジオネラ汚染を防止するという可能性につながることも期待される。

#### E. 結論

*L. pneumophila* と環境中のアメーバの感染実

験結果から、菌の遺伝子型グループにより宿主アメーバに対する適合性が異なることが示された。この結果は野外におけるレジオネラ属菌の分布、生態の決定要因に環境中のアメーバ相が関与していることを示唆するものであった。レジオネラ属菌に対する抑制因子としてのアメーバの存在が指摘され、その重要性を今後明らかにする必要があることも示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

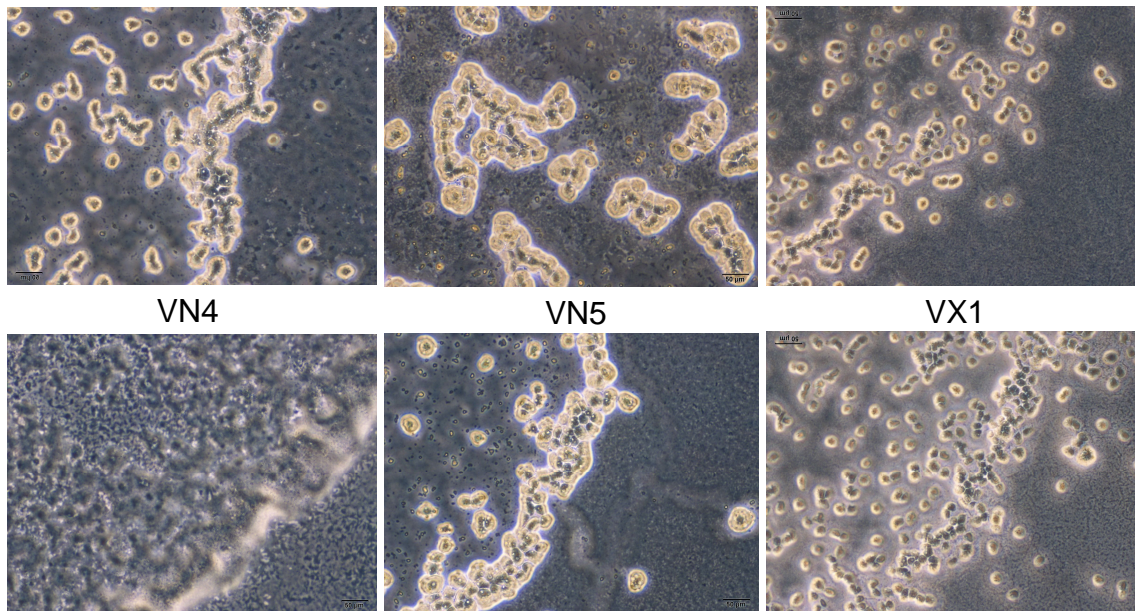
#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

#### 大腸菌培養



#### 患者由来株感染

図-1、大腸菌培養と患者由来株 (SG1) の感染における VN および VX の増殖状況

VN4 株は患者由来株に感染し死滅するが、VN5 および VX1 では患者由来株が存在しても大腸菌培養と同様な増殖性を示した。

表-1、遺伝型グループ(亜種レベル)分類に基づく *L.pneumonia* 菌株とアメーバ感染の関係

菌株	ソース	ST	血清型	グループ	Subspp.	AC1	AC2	NG1	NG2	NG3	NG4	NG5	NG6	NG7	VN1	VN2	VN3	VN4	VN5	VX1
Lp080-045	患者		SG1		pneumo.									±					+	+
1	患者	36	SG1		pneumo.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1052	冷却塔	1	OLDA	C1	pneumo. ?									±		+	±		+	+
1592	冷却塔	1	Oxford	C1	pneumo. ?									±		±	+	+	+	+
5	冷却塔		SG5	C2	fraseri	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
590	冷却塔	154	Oxford	C2	fraseri							+	+	+	+	+	+	+	+	+
595	冷却塔	150	Oxford	C2	fraseri								+	+	+	+	+	+	+	+
694	冷却塔	598	Oxford	C2	fraseri							+	+	+	+	+	+	+	+	+
1269	冷却塔	607	Oxford	C2	fraseri							+	+	+	+	+	+	+	+	+
2501	喀痰	595	SG1	C2	fraseri							+	+	+	+	+	+	+	+	+
2514	喀痰	608	SG1	C2	fraseri								+	+	+	+	+	+	+	+
2709	冷却塔	986	SG1	C2	fraseri							+	+	+	+	+	+	+	+	+
2907	浴槽	1290	SG1	C2	fraseri							+	+	+	+	+	+	+	+	+
2343	土壌	741	Philadel.	S1?	fraseri							+	+	+	+	+	+	+	+	+
2564	喀痰	701	SG1	S1?	fraseri							+	+	+	+	+	+	+	+	+
2752	喀痰	1023	SG1	S1?	fraseri							+	+	+	+	+	+	+	+	+
150	シャワー		SG5		pascullei	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2781	給水系		SG5		pascullei	+						+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.coli (対照)						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

AC: *Acanthamoeba* sp.

NG: *Naegleria* sp.

VN: *Vannella* sp.

VX: *Vexillifera* sp.

+: アメーバ増殖を示す (レジオネラ非感染性)

- : アメーバ死滅を示す (レジオネラ感染性)

±: 栄養体の増殖が認められるも、一部で菌の感染があり細胞内増殖による破壊が認められる。