

厚労科研(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
「公衆浴場等施設の衛生管理におけるレジオネラ症対策に関する研究」
平成 28 年度 分担研究報告書

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

レジオネラ感染とアメーバ
レジオネラ属菌感染促進物質の探索

研究要旨:

1. レジオネラ属菌の宿主アメーバ感染における感染促進物質の探索を行った。
2. 探索物質の条件として、極性、荷電、親水性に影響を及ぼす可能性のあるものとし、単一あるいは数個の分子からなる低分子量のものから、高分子糖鎖(分子量数万以上)のものを調べた。
3. 低分子量の物質には感染性に対する影響が見られなかった一方、高分子糖鎖にヘパリンと同等の感染促進作用が認められた。この促進作用がみられたのは、ヘパリン、コンドロイチン硫酸およびデキストラン硫酸で、硫酸基を分子構造中に一定の割合で含む硫酸化多糖であった。同じ高分子糖鎖で非硫酸化多糖のヒアルロン酸は、逆に感染抑制の作用を示した。
4. 硫酸化多糖類には環境中の難培養性レジオネラ属菌をアメーバ培養法でサルベージできる効果があることが期待された。

A. 研究目的

これまでの研究で、レジオネラ属菌のアメーバ感染における各種の糖鎖分子および糖鎖特異的レクチンによる抑制および促進効果を明らかにし、糖鎖の関与する受容体を介した感染機構の存在を示唆する結果を得た。また糖鎖の中でも高分子糖鎖であるヘパリンに高い感染促進効果があるという興味深い知見も得た。ヘパリンは硫酸基をもつ多糖(硫酸化多糖)に分類され、負電荷、酸性そして親水性という性質をもつ。レジオネラ属菌はその菌体表面を覆う LPS(リポポリサッカライド)の特性から、菌体表面の強い疎水性が想定されている。ヘパリンの感染促進作用は、受容体反応を修飾し、これを強化するのか、あるいは別の非特異的な取り込み反応を促進するのか、あるいはその両者なのか、これまで不明である。作用機序は不明であるが、ヘパリンのような、レジオネラ属菌のアメーバ感染を促進する物質の存在は、アメーバを利用したレジオネラ属菌の環境からの分離、増殖法に大いに有用となることが期待される。そこで本年度はヘパリンと同様な感染促進効果を有する物質の探索を目的に研究を進めた。

B. 研究方法

1. レジオネラ属菌株

L. pneumophila SG1 378 株(Lp と省略)を用いた。菌株は BCYE 培地にて 30 で培養し実験に供した。

2. アメーバ株

A. castellanii 1501/10 株を用いた。培養は無菌培養用 PYGC 培地を用い、30 で、培地を 2-3 日毎に交換し新鮮な栄養体を実験に供した。

3. 菌のアメーバ感染性試験に用いた物質

親水性等を付与する可能性のある物質として以下の物質を用いた。低分子量: TritonX100、DMSO(ジメチルスルフォキシド)、サポニン、タウリン、グルタチオン、高分子量: ヘパリン、コンドロイチン硫酸 B および C、デキストラン硫酸、ヒアルロン酸

4. アメーバに対する Lp 感染試験

PYGC で培養したアメーバをフラスコより剥離し、

PBS(-)で遠心洗浄後、さらに 10xAS で遠心洗浄を行い、10xAS で 1×10^5 /ml に細胞浮遊液を調整した。24 ウェルマイクロプレートウェル内に浮遊液を 0.5ml 入れ、1 時間培養しアメーバをプレートに接着させた。被検物質は 10xAS で希釈し、試験濃度に調整した溶液 300 μ l をマイクロプレート内の 10xAS と置換し、1 時間 30 でアメーバを培養した。なお、対照実験には 10xAS を用いた。

Lp は 10xAS で 0.1OD に調整し、その 30 μ l をマイクロプレートのアメーバ培養ウェルに加え、静かに攪拌し 30 で 3 時間培養した。その後 50 μ g/ml となるように gentamycin を添加し、未感染のアメーバ外にある菌を不活化した。さらに培養を継続し、感染 18 時間後にプレート底面全体を氷水上につけアメーバを剥離し、アメーバ浮遊液を回収、遠心 (500rpm \times 3 分間) で浮遊する菌を分離除去した。濃縮されたアメーバ浮遊液をスライドグラスに塗布後、ギムザ染色を行った、細胞内に分裂増殖像を示す、あるいは単独で存在する菌が明確であるアメーバを感染細胞として、その数を測定し感染率を求めた。なお細胞はランダムに約 500 個を調べた。

5. 死菌を用いた感染実験

10xAS で 0.1OD に調整した Lp の浮遊液 200 μ l を、ヒートブロックを用いて 90、15 分間加熱処理した。その 30 μ l を用いて、マイクロプレートのアメーバ培養ウェルに加え、静かに攪拌し 30 で 3 時間培養した。その後 50 μ g/ml となるように gentamycin を添加した。なお菌の不活化をみるために BacLight による染色を行い、蛍光顕微鏡にて死菌の確認を行った。

6. gentamicin 存在下での感染実験

アメーバのレジオネラ属菌感染を 3 時間で終了させるために行う gentamicin 処理において、gentamicin 存在下での菌感染が生じないことを確認するために、10xAS を対照として、gentamicin 50 μ g/ml 存在下で上記同様の方法でレジオネラ属菌感染実験を行った。

C. 研究結果

低分子化合物の効果

今回用いた低分子物質の存在下でのレジオネラ属菌感染の結果 (相対感染率) を表 1 にまとめた。界面活性作用等細胞膜作用のある物質を試験す

るため、予備実験でアメーバの生理的、形態的变化が生じない濃度を確認後、試験を行った。10xAS で 10-20% の感染率が見られた菌は、感染促進効果の比較対照として調べたヘパリン 1000U/ml の存在下で感染率は約 2 倍に上昇した。

この菌に対し、親水性と疎水性をつなぐ界面活性効果のある TritonX100 およびサボン、極性溶媒で親水性を付加すると考えられる DMSO、ヘパリン同様分子内に硫黄を含む物質タウリン、グルタチオン (還元型) は、いずれも対照である 10xAS との間に感染率に差は認められなかった。

高分子多糖類の効果

今回用いた高分子多糖類の構造と分子量、またそれらの存在下でのレジオネラ属菌感染の結果 (相対感染率) を表 2 にまとめた。10xAS で 10-20% の感染率が見られた菌は、ヘパリン 10mg/ml の存在下で感染率は約 2 倍に上昇した。その他に感染率の上昇がみられたのは 10mg/ml の条件でコンドロイチン硫酸 B およびコンドロイチン硫酸 C およびデキストラン硫酸であり、その感染率上昇の度合いはヘパリンとほぼ同様であった。いずれの多糖も 1mg/ml の条件では感染率に対照と差は見られなかった。一方、ヒアルロン酸 10 mg/ml は明らかに感染率の低下が認められ、しかし 1 mg/ml では対照と差は見られなかった。なお試験した各多糖類溶液の pH は 6.8-6.9 であり、培養中のアメーバに形態的な変化は認められなかった。また試験した多糖類には分子構造上粘性が生じ、ヒアルロン酸は特に強い粘性を生ずるが、マイクロプレートウェル内の試験溶液中のレジオネラ属菌の分散度合いは対照と各種多糖類溶液との間に大差は観察されず、粘性の影響は極めて低いものと推察された。

感染促進作用のみられるヘパリンの作用機序を知るために、アメーバとレジオネラ属菌を各々優先的にヘパリン処理した場合の感染率の結果を図 1 に示した。アメーバを 10 mg/ml のヘパリンで前処理後洗浄した場合、感染率は対照と差がなく、また 10 mg/ml でヘパリン処理したレジオネラ属菌を洗浄せずに感染させた場合、これとヘパリン濃度が同じ (1 mg/ml) であるアメーバ前処理の場合と感染率に差がみられなかった。

死菌を用いた感染実験

結果を表 3 に示した。10xAS に対し約 40% の感染率を示し、ヘパリン存在下では約 2 倍の感染率上昇を示した菌は、90 で 15 分間の加熱処理後、

その感染率は0.1%に減少し、ヘパリン存在下でも感染率の回復は認められなかった。加熱処理後の菌はBacLightによる染色ですべて赤色蛍光に染色されており、死菌と判断された。光学顕微鏡レベルでの形態的な変化は特に観察されなかった。

gentamicin 存在下での感染実験

結果を表4に示した。10xASに対し約64%の感染率を示し、ヘパリン存在下では約1.4倍の感染率上昇を示した菌は、菌の感染開始時から50 µg/ml gentamicin の存在下で菌を感染させたところ、感染率は約0.2%であった。また感染率はヘパリンにより約1%に上昇した。

D. 考 察

前年度研究では、菌とアメーバの感染において、糖鎖分子の関与する受容体が感染の一端を担っていることが示唆された。また抗血液凝固作用が一般的に知られるヘパリンが感染促進効果を示すという結果は、その分子構造の巨大さから、一般的な受容体反応とは異なり、特異性の低い、いわゆるアメーバやマクロファージなどの貪食細胞の示す異物取り込み反応に近い感染の様式もある可能性が示唆するものであった。そこで本研究では効率的なレジオネラ属菌のアメーバ感染方法の確立という目的も踏まえ、このヘパリン様効果に注目し、これを有する物質のさらなる検索を進めた。特に親水性を付与する効果に関して、低分子、高分子物質を選択しその効果を調べた。その結果、低分子の被検物質は感染の抑制および促進のどちらの効果も明らかではなかったのに対し、高分子の被検物質の中にヘパリン同等の感染促進効果が認められるものを見出した。この促進効果の見られた物質は、一般的に硫酸化多糖と称されるもので、構成する単糖の種類は異なるものの、それらの連続した多糖分子構造の中に一定の割合で硫酸基を含むことにより、強い保水力、すなわち親水性を示すという共通した特徴がある。本研究では、硫酸基を含まない多糖としてヒアルロン酸のみ試験に供したが、ヒアルロン酸は逆に感染抑制の効果を示すという結果となった。この同じ高分子多糖類でありながら抑制という他の硫酸化多糖類とは正反対の結果について、部分的にはあるが説明を試みるならば、硫酸基を介した菌とアメーバの相互作用の不在と、ヒアルロン酸高分子構造による物理的な特異的受容体反応のマスク効果が

考えられる。高分子糖鎖の硫酸基が感染に重要な影響を与える要因となるかどうかは、ヒアルロン酸以外の硫酸基をもたない糖鎖分子についての検証が必要であろう。

明らかに感染を促進するというヘパリンの作用が、アメーバか、あるいはレジオネラ属菌のどちらに働いているのかを調べた結果では、ヘパリンのアメーバおよび菌への結合力が低いことが原因と考えられるが、明確な答えは得られなかった。ヘパリンは抗血液凝固作用等に見られるタンパク質との結合が、その一般的な生理作用として知られ、pH やイオン環境がその作用に影響する。ヘパリン等硫酸化多糖類の作用機序を考えるには、タンパク質との結合性を想定した解析がさらに必要と考えられた。

アメーバに対するレジオネラ属菌感染では、菌の培養日数の増加とともに感染率が低下する。と同時に、感染した菌の細胞内での増殖性の低下も見られる。即ち単独あるいは分裂回数が少ない段階の菌として観察される。本研究で加熱処理した菌は取り込まれるとしても細胞内に残存しないこと、また Gentamicin 添加は菌の感染を極めて強力に抑えることが明らかにされたことから、感染後にアメーバ内に観察される多数の単独性の菌は生きており、ただ分裂を停止している状態と考えられる。これが所謂VNC (viable but not culturable) 状態の菌と考える証左は現状得られていないが、これまでの研究でのデータより、この単独で細胞内に存在する菌の割合を再解析したところ、ヘパリン存在下で、このようなアメーバ内に単個に感染(あるいは単に取り込まれる可能性もあるが)する菌も多くなることが分かった(図2)。分裂能力が衰え培養による検出が困難な菌であっても、アメーバを用いた培養によりアメーバ内にサルベージが可能で、これによりこれまで実態として把握が困難であった難培養性のレジオネラ属菌の検出、確保が可能となるのではないかと考えられる。今後はこのような単個に感染する菌の細胞内増殖を促進する因子を明らかにし、難培養性の菌のアメーバ内培養を可能にする方法を開発する。

E. 結 論

レジオネラ属菌のアメーバ感染において、分子内に硫酸基を含む硫酸化多糖類が感染促進効果を有することが示された。この硫酸化多糖類には、分裂能力が衰え難培養性に陥った菌をサルベージできる可能性があり、これをさらに応用開発する

ことにより、実態把握が困難であった難培養性レジオネラ属菌の実態が明らかになることが期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表 1、レジオネラ属菌のアメーバ感染における低分子物質の効果

試験物質	濃度	相対感染度	分子量
10xAS		1.0	
ヘパリン*	1000U/ml	7.6	表 2 参照
Triton X100	0.001 %	0.7	647
DMSO	0.01%	0.5	78.13
	0.001%	0.5	
サポニン(大豆)	0.01%	0.3	943.12
	0.001%	0.5	
10xAS		1.0	
ヘパリン	1000U/ml	2.9	表 2 参照
タウリン	100mM	1.1	125.15
グルタチオン	10mM	1.0	307.33

* 感染促進効果の比較対照として調べた

表 2、レジオネラ属菌のアメーバ感染における高分子物質の効果

試験物質	濃度	相対感染度	分子構造(ウロン酸 アミノ糖) 分子量
10xAS		1.0	
ヘパリン	10mg/ml	2.0	グルクロン酸/イズロン酸-グルコサミン 6,000 ~ 20,000
コンドロイチン硫酸 B (デルマトン硫酸)	10mg/ml	2.0	イズロン酸-アセチルガラクトサミン 60,000 ~ 150,000
	1mg/ml	0.8	
コンドロイチン硫酸 C	10mg/ml	1.5	グルクロン酸-アセチルガラクトサミン 60,000 ~ 150,000
	1mg/ml	0.8	
ヒアルロン酸	10mg/ml	0.3	グルクロン酸-グルコサミン 1,000,000 以下
	1mg/ml	0.7	
デキストラン硫酸	10mg/m	2.4	グルコース 36,000 ~ 50,000
	1mg/ml	0.8	

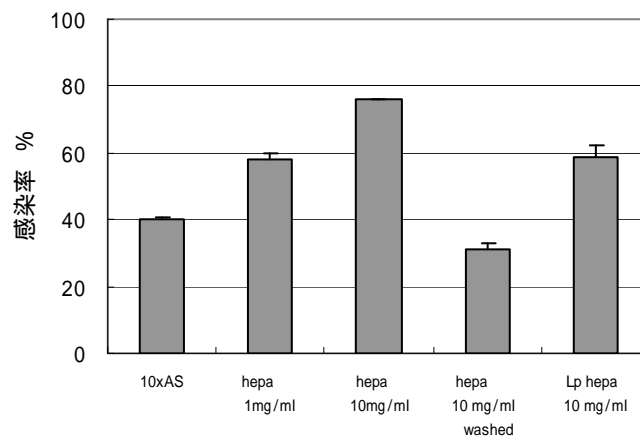


図 1、レジオネラ属菌のアメーバ感染におけるヘパリンの作用

hepa 10mg/ml wash はアメーバを 10mg/ml ヘパリンで前処理後 10xAS で 3 回洗浄し、10xAS で Lp を感染させた結果を、また Lp hepa 10mg/ml は菌をヘパリン 10mg/ml で前処理後、その菌浮遊液を用いて 10xAS で感染させた結果を示す

表 3、加熱処理によるレジオネラ属菌の感染性の変化

試験条件	試験条件	感染率%	相対感染度
未処理	10xAS	43.5	1.0
	ヘパリン(1000U/ml)	81.7	1.9
90 15分 熱処理	10xAS	0.1	0.0
	ヘパリン(1000U/ml)	0.0	0.0

表 4、gentamicin によるレジオネラ属菌の感染性の変化

試験条件	感染率%	相対感染度
10xAS	63.5	1.0
ヘパリン(1000U/ml)	87.4	1.4
gentamicin (50 µg/ml)	0.2	0.0
gentamicin+ヘパリン*	0.9	0.0

*50 µg/ml gentamicin 処理した菌を 1000U/mlヘパリン存在下でアメーバに感染させた

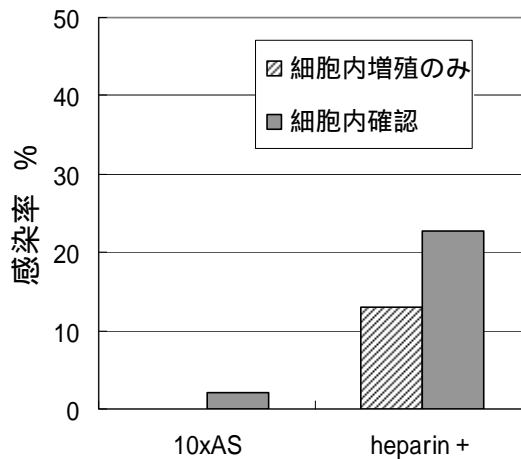


図 2、感染したレジオネラ属菌の細胞内増殖性とアメーバ感染率

細胞内増殖のみは、感染アメーバ細胞内で菌の増殖(菌体分裂が明らか)が認められた結果を、また細胞内確認は、一個以上の菌が確認された結果を示す。また heparin+は 1000U/ml で感染させた結果を示す。なお感染させたレジオネラ属菌は培養 8 日後の菌で、BCYE 上での発育能がおよそ 1/1000 に低下していた。生死判別用 BacLight 染色では死菌率 40-60%であった。