

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 29 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
研究分担者 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

レジオネラ属菌のアメーバ内生残性の実験的制御

研究要旨:

1. 難培養性のレジオネラ属菌を用いて、菌のアメーバ内生残および分裂増殖におけるファゴソーム形成およびライソゾーム融合の阻害剤効果を調べた。
2. ファゴソーム内活性酸素産生を阻害するアポシニン、およびライソゾームの内部pHを中性化しその加水分解酵素作用を阻害するクロロキンならびに塩化アンモニウムは、いずれもアメーバ感染率を増加させる効果が認められた。
3. アポシニンと塩化アンモニウムによる同時暴露実験では、アメーバ感染率増加に明確な相乗効果は認められなかった。一方ヘパリンにこれらの物質との相乗効果の可能性が示された。
4. 本研究により、ファゴソーム形成およびライソゾーム融合の過程を実験的にコントロールすることで、難培養性レジオネラ属菌のアメーバ内増殖促進までは至らなかったが、その生残性を高めることが可能であることが示された。

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いて、初期段階である接着と取り込み二糖鎖分子が関与していること、さらにヘパリンに代表される硫酸基をもつ多糖(硫酸化多糖)にレジオネラ属菌の感染促進効果があることが示された。実験的(培養菌株)に発育性が低下し、またアメーバへの感染性も低下した菌であっても、硫酸化多糖類の存在下でアメーバへの感染性、さらには細胞内増殖性も向上する。

一方、BCYE α での培養日数(30℃培養)が1週間を超えると、レジオネラ属菌はアメーバ感染性が大きく低下し、感染しても細胞内増殖性がみられず、取り込まれた菌体は個々に観察されるようになる。このような菌の細胞学的特性の詳細は不明であるが、おそらく野外の環境中であって、栄養的に飢餓状態におかれたVNC(viable but not culturable)の状態に近いのではないかと考えられる。このような菌はさらに培養日数が進むと、硫酸化多糖の感染促進効果も表れにくくなる。このような難培養化した菌が環境中にあることは一

般的に想定されるものと思われる。その理由は、温泉浴槽水において培養陰性、遺伝子検査陽性という場合が少なくないという現状があるからである。実際の環境中には培養により容易に検出され病原性も明らかな菌のみならず、難培養性の菌も混在していることを考慮すれば、レジオネラ感染を理解する上では、難培養性の菌の解析も重要な課題になるものと考えられる。

本年度は、アメーバに取り込まれた後に細胞内で生残、そして増殖する過程に注目し、難培養化した菌に関して、実験的にファゴソーム形成およびライソゾーム融合を阻害することによる細胞内での動態変化を調べた。

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 α 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(ACと省略)を用いた。培養は無菌培養用 PYGC 培地を用い、30°C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. 試薬類

一般に細胞の貪食過程で起こるファゴソームでの活性酸素産生、ならびにその後続くライゾーム融合において阻害的に作用する以下の物質を用いた。アポシニン (Apocynin : 4'-Hydroxy-3'-methoxyacetophenone, SIGMA - ALDRICH) はファゴソーム形成において NADPH オキシダーゼの機能を阻害し活性酸素産生を抑制することが知られる。クロロキン (Chloroquine diphosphate, SIGMA-ALDRICH) および塩化アンモニウム(NH₄Cl, 和光純薬) はライゾームに取り込まれることでその内部pH を上昇させ、ライゾーム内の各種加水分解酵素反応を阻止することが知られる。使用にあたっては、アポシニンは少量のエタノールで溶解後、クロロキンはそのまま 10xAS で 10mM に調整し、ストック溶液とした。塩化アンモニウムは 10xAS で 100mM に調整し、ストック溶液とした。またこれまでに菌のアメーバ内取り込みに促進効果の見られたヘパリン (和光純薬) は、10xAS で 10,000U/ml に調整し、ストック溶液とした。

4. AC に対する Lp 感染試験

PYGC で培養した AC 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 1x10⁵/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 で単独あるいは混合して試験濃度に調整し、その溶液 300 μl をマイクロプレート内の 10xAS と置換し、1 時間 30°C 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 で菌濃度を調整し、原則として 0.1OD に調整した菌溶液を実験に用いた。感染に際してはその 30 μl をマイクロプレートのアメーバ培養ウェル(300 μl のメデイウム)に加え、静かに攪拌し 30°C で 3 時間培養した。その後 50 μg/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、さらに培養を継続した。所定の培養時間において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 x 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。

C. 研究結果

アポシニン、クロロキンならびに塩化アンモニウムの、単独暴露による効果

図1および2に BCYE α 培養(以下、培養と略)7 日後(D7)の菌を用いたときの、アポシニン、クロロキンならびに塩化アンモニウムの効果を示した。結果はこれらの物質添加条件での培養1日目のアメーバ感染率で表している。10xAS のみの対照実験ではアメーバ感染率は 1.3%であった。アポシニンおよびクロロキンは 100 μM で効果が認められるという報告があり^{1,2)}、ややそれより高濃度まで調べたところ、400 μM まで濃度依存的にアメーバ感染率が増加した。その効果はアポシニンの方がクロロキンよりも高かった。ギムザ染色での所見は、10xAS ではアメーバあたり菌数は 1 だけであったが、アポシニン、クロロキン添加の場合、アメーバあたりの菌は複数の場合も見られた。アポシニン添加で細胞内増殖が確実にあったと考えられる分裂増を示す菌体が 1 アメーバだけであるが認められた(図3)。なお培養中に丸く浮遊する細胞が若干みられたが、細胞変性の様子はなく単に付着が不可能なだけで細胞毒性によるものではないと考えられた。一方塩化アンモニウムはやはり濃度依存的に感染率増加の効果がみられるものの、効果の発現にはアポシニン、クロロキンよりも高濃度を要した。また 50mM では効果の低下がみられたが、この濃度では空包化など細胞変性が観察され、アメーバに対する細胞毒性が一部生じたものと考えられた。

アポシニンと塩化アンモニウムの同時暴露の効果

図4には培養8日後(D8)の菌を用いて 200 μM アポシニンと 25mM 塩化アンモニウムを単独あるいは混合して、培養を3日間行ったときの結果を示した。10xAS のみの対照実験ではアメーバ感染率は 1-2%であった。これに対し単独で用いた場合、アポシニン、塩化アンモニウムともに培養1日目ではアメーバ感染率の増加がみられたが、3日目になるとアポシニンの場合は10%の感染率が大きく低下、一方塩化アンモニウムは感染率が 20%程度に維持された。アポシニンと塩化アンモニウムを混合し

最終濃度がそれぞれ 200 μ M と 25mM に調整された条件では、培養 1 日目は塩化アンモニウム単独の場合とほぼ同様の感染率が、培養 3 日目はさらに上昇し約 50%となった。アメーバあたりの菌数は数十の場合もあり、菌がランダムに取り込まれている像を呈した。菌は多数アメーバ内にあるものの、明確に細胞分裂を示す菌は観察されなかった。

ヘパリンの相乗効果

図 5 には培養 10 日後 (D10) の菌を用いて、400 μ M アポシニンと 25mM 塩化アンモニウムを単独あるいは混合して用いる条件に加え、1,000U/ml のヘパリンを加えたときの、培養 3 日後のアメーバ感染率を示した。この実験では培養 1 日目におけるアメーバ感染率がすべての試験で 0% であり、培養 3 日目でもアポシニンと塩化アンモニウム単独あるいは混合した条件では感染率は数%であった。一方、これらの条件にヘパリンがさらに加えられた条件では、アメーバ感染率の増加が認められた。ヘパリン単独におけるアメーバ感染率との比較からは、アポシニンとの相乗効果の可能性が示された。一方塩化アンモニウムとの相乗効果は不明であった。菌体はアメーバあたり複数個が個別に vacuole 内に存在する場合も見られたが、細胞内増殖を示す像は観察されなかった。

塩化アンモニウムの感染促進効果と暴露条件

図 6 には培養 11 日後 (D11) の菌を用いて 30mM 塩化アンモニウムの条件で培養を 4 日間行った結果を示した。この実験では、感染菌濃度が 0.01OD ではアメーバによる取り込みがほとんどないものと予想し、他の実験よりも 10 倍濃い 0.1OD で感染を行った。また多量の菌を添加したことから、培養 3 時間後に菌を洗浄除去し、その後の培養は抗生物質を含む 10xAS に置換して行った。10xAS のみの対照実験ではアメーバ感染率は 2.3% で、4 日間の感染率はそれ以下を示した。一方感染促進効果の期待できる 30mM 塩化アンモニウム L を添加した場合、培養 1 日目は約 50% の感染率を示したが、2 日目以後、感染率は大きく低下し、対照よりはわずかに多い 3-4% を示した。2 日目以後わずかにアメーバに感染する菌には、細部内増殖をうかがわせる菌の集塊がみられる場合があった (図 7)。

D. 考察

野外の環境中に存在するレジオネラ属菌は、本菌の栄養要求特異性、即ちブドウ糖非発酵性でアミノ酸を炭素源とする栄養要求性を考慮すると、

そのほとんどは栄養枯渇の飢餓状態にあると推測される。遺伝子レベルで存在を知ることができるが、培養による検出は難しい菌はこのような特徴のある菌ではないかと考えられる。レジオネラ症の現状を見る限り、このような検出・把握が難しい難培養性の菌もレジオネラ感染症に関与していることは想定内と考える、その実態を解明することでより正確なレジオネラ症の理解とその対策につなげることが本研究の課題である。

本年度は、難培養性のレジオネラ属菌をアメーバを用いて検出、また分離確保する方法論の開発の中で、菌の取り込み後の細胞内生残および増殖過程に関与すると考えられる因子について検討を行った。レジオネラ属菌の細胞内生残および増殖には、大きくファゴサイトーシスと、これにリゾソームが癒合したファゴリゾーム形成の 2 段階の菌分解過程が関与し、菌はこれらの危機に耐え生残しなければならない。まず感染の初期段階であるファゴサイトーシスにおいて、正常なレジオネラ属菌は活性酸素の攻撃を阻止する因子 (エフェクターと呼ばれる) 等を多数ファゴソーム内に放出する。活性酸素はファゴソーム膜上の NADPH オキシダーゼが産生するので実験的にこれを阻害することが可能である。その阻害剤の一つとして知られるアポシニンは、今回の実験により、本来アメーバにより取り込まれた後分解消失する菌の生残性を高める効果を示し、ファゴソーム内の活性酸素阻害が菌の生残に有効に働くことを証明した。アポシニン存在下ではリゾソーム融合は進行すると考えられるが、今回リゾソーム融合が正常に起こっているのかは確認していないので推論ではあるが、活性酸素阻害だけでも生残の可能性が高まるという結果となった。

次にファゴソームとリゾソームの融合過程について、両者の融合により形成されるファゴリゾーム内ではリゾソーム由来の加水分解酵素が菌の分解を行うが、正常なレジオネラ属菌では、ファゴソーム内に放出されたエフェクターの作用でファゴソームとリゾソームの融合が阻害されるという考えが出されている。これを実験的に再現するのは困難であるので、今回はリゾソームに直接的に作用する物質を試験した。クロロキシンと塩化アンモニウムは、酸性 (約 pH 4.7) に保たれるリゾソームに取り込まれると、その pH を上昇させ酸性で作用する加水分解酵素機能を抑制する効果を示す。今回調べたクロロキシンと塩化アンモニウムには菌の生残性向上効果が認められ、リゾソーム阻害が生残に有効に働くことを証明した。

今回明瞭な効果を示した塩化アンモニウムには VNC 化したコレラ菌の培養活性化の効果があることが知られている³⁾。今回の実験で、レジオネラ属菌に対してもその直接的な効果があったのかどうかは分からないが、塩化アンモニウムによるリソゾーム阻害効果は、培養日数が 11 日となる古い菌株でもみられたことから、塩化アンモニウム中での菌前培養がさらに生残性を高める可能性、そして *in vitro* でのレジオネラ属菌培養への塩化アンモニウム利用の可能性について、今後さらにその効果を明らかにしていきたい。

単独で有効な作用をもたらすこれらの物質を同時に作用させれば、理論的にはその相乗効果が期待されるが、アポシニンと塩化アンモニウムに関しては今回の実験ではその効果は明確ではなかった。一方、その作用機序が不明な点があるが、これまで難培養化した菌の感染性を向上させる効果をもつヘパリンに、その相乗効果がありそうだという結果を得た。ただ明確に相乗効果があると結論するには至っていない。最適な濃度の阻害剤・ヘパリンの組み合わせがあるはずで、その相乗効果を利用すれば難培養化した菌の環境からのサルベージは可能であると考えている。

培養日数が少ない 3-4 日の菌は感染率が高いと同時に高い分裂増殖能を示すので、本研究の結果は、この性質が培養が進むとともに喪失していき、生残すら不可能という状況に陥ることを示している。しかしこの生残条件は実験的にコントロールできる可能性がある。問題は難培養の菌を株として回収するために増殖させることであるが、今回分裂像を示す菌の割合は極めて少なかった。この点に関しては用いる菌の *viability* がある程度維持されていること、また野外の過酷な環境を考えると、生理学的回復にはアメーバ取り込み後の培養日数も相当必要なのかも知れない。また栄養や代謝面での回復促進因子を外部から与えることも考える必要がある。菌の細胞内分裂に焦点をあてた研究をさらに進めることが今後の課題である。

E. 結論

アメーバへの取り込み後のレジオネラ属菌の生残は、ファゴサイトーシスと、これにリソゾームが癒合したファゴリソゾーム形成という一連のプロセスを阻害することで保障される。本研究で、このプロセスが実験的に阻害可能であることが明らかとなった。野外から難培養菌を回収し、そして生残させる方法論について、具体的な技術開発の可能性が開かれた。

参考文献

1. Ohkuma S et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA, 75(7), 3327-3331,1978
2. Br.J Pharmacol.,161(4), 885-898,2010
3. Wai S.N.et al., FEMS Microbiol. Lett, 136:187-191, 1996

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

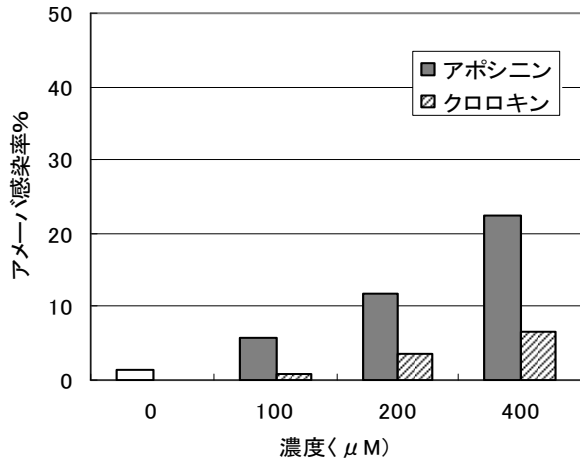


図1、アポシニンならびにクロロキンのレジオネラ属菌アメーバ感染率に及ぼす影響(レジオネラ属菌は培養7日目を使用)

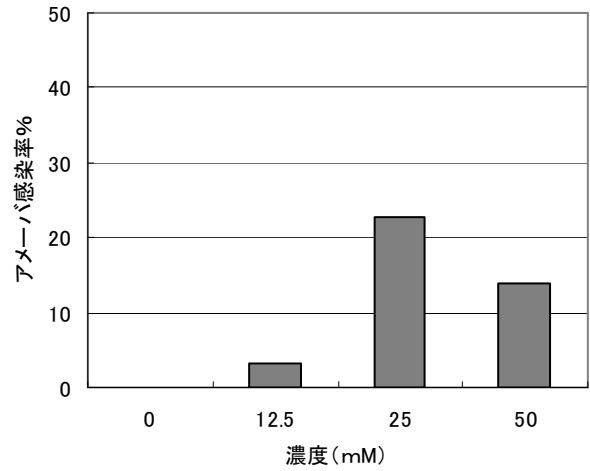


図2、塩化アンモニウムのレジオネラ属菌アメーバ感染率に及ぼす影響(レジオネラ属菌は培養7日目を使用)

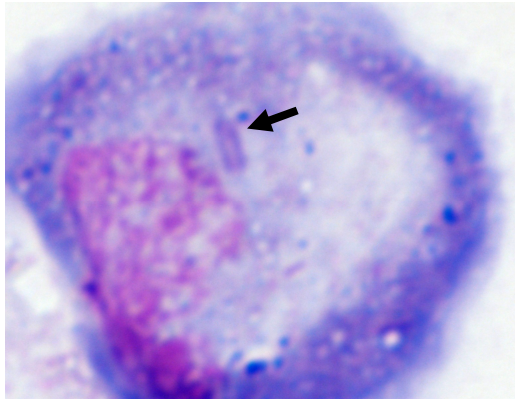


図3、100 μM アポシニン添加条件のアメーバ感染で観察されたレジオネラ属菌の細胞内増殖像

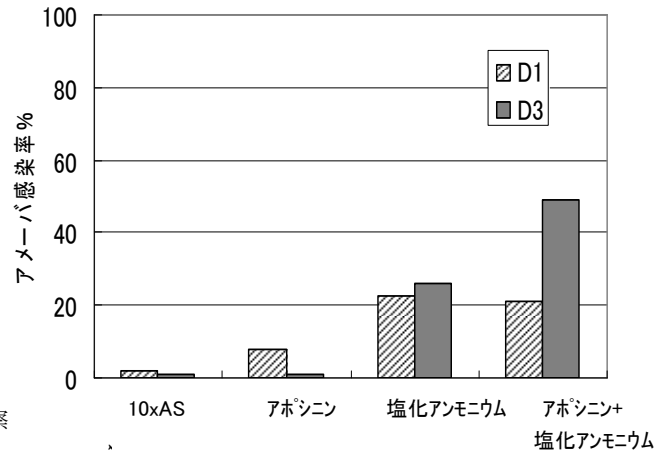


図4、アポシニンと塩化アンモニウムの同時暴露がアメーバ感染率に及ぼす影響(レジオネラ属菌は培養8日目を使用)

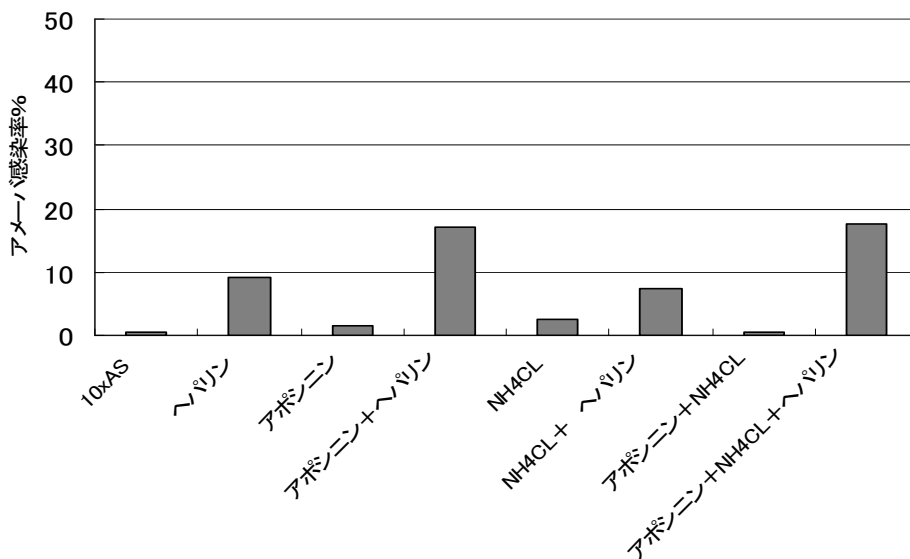


図5、アポシニン、塩化アンモニウムならびにヘパリンの同時暴露がアメーバ感染率に及ぼす影響(レジオネラ属菌は培養10日目を使用)

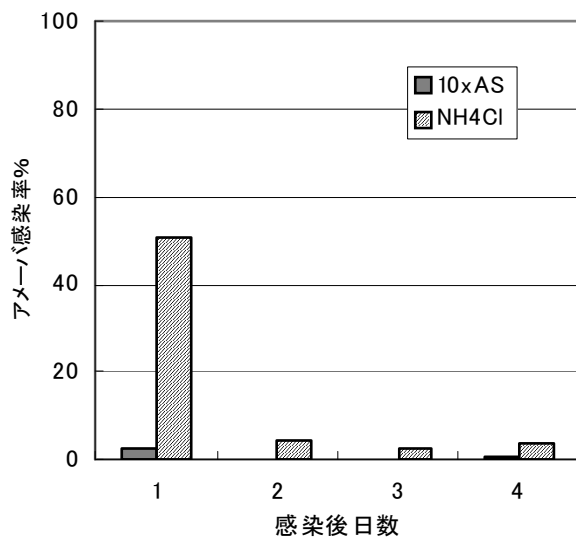


図 6、30mM 塩化アンモニウム添加条件で感染後、塩化アンモニウムを除去したときのアメーバ感染率の変化 (レジオネラ属菌は培養 11 日目を使用)

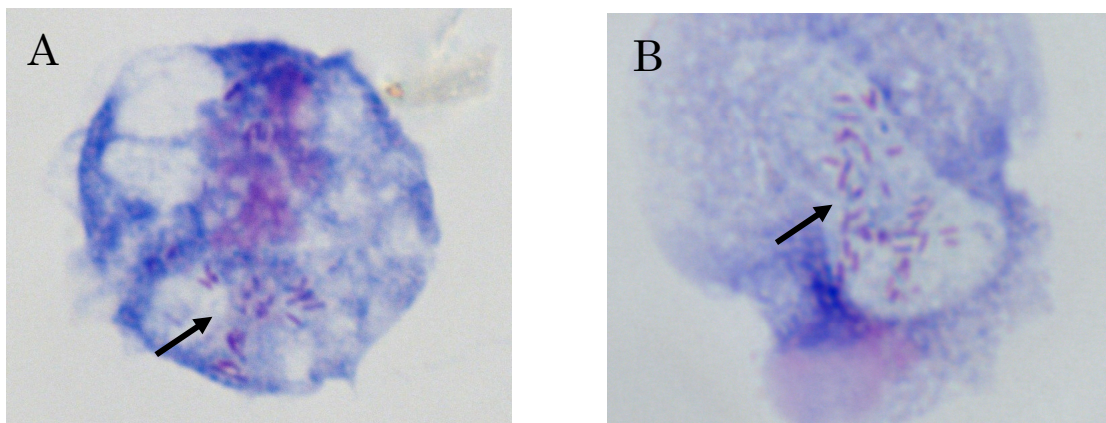


図7、30mM 塩化アンモニウム添加条件で感染後、1 日目 (A) ならびに 4 日目 (B) に観察された アメーバ内レジオネラ属菌 (感染させたレジオネラ属菌は培養 11 日目を使用)