

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 30 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 VNC 菌モデルと BCYE α での VNC 菌検出

研究要旨:

1. ボトル水系環境を用いたレジオネラ属菌 VNC 菌モデル実験を行った。BCYE α で CFU を測定し、BacLight により生菌数を測定した。室温で約 7 週間培養した時点で VNC 菌が約 64% 存在した。一方同時に進めた 4℃ での培養では、VNC 菌がほとんど確認できなかった。
2. 酸化ストレス抑制効果や細胞内代謝、DNA 合成促進に関与する物質をサプリメントの形で BCYE α に添加したが、VNC 菌の発育を促進するものはなかった。
3. BCYE α 製品により菌の発育性が異なり、VNC 菌の評価に影響を与えること、また培養可能な菌の過少評価につながる可能性があることが示された。また調べた中では BD 社の自家調製 BCYE α において CFU が最も高かった。
4. 培地基材である寒天は、製品により培養可能な菌の発育が低下するものがみられ、BCYE α での菌発育に影響する因子の一つと考えられた。

A. 研究目的

これまでの宿主アメーバとレジオネラ属菌の相互作用に関する研究から、環境細菌であるレジオネラ属菌には BCYE α で難培養化する、いわゆる他の細菌類で観察される VNC (Viable but not culturable) 菌と同様な生物学的変化が生ずることが示されてきた。遺伝子検査では存在が示唆されるものの、実際に目にみえない VNC 菌の存在は、レジオネラ属菌の生態、汚染の評価、感染リスクなど、あらゆるレジオネラ症の問題に関わる重要な問題であると考えられ、これを解析する手段が必要である。

本研究はこのレジオネラ属菌における VNC 菌の問題に対し、実験的に VNC 菌を誘導し、これを *in vitro* 検査、即ち汎用性のある寒天平板培地を用いて培養可能にし、その存在を可視化する方法を確立することにある。本年度は VNC 菌のモデル実験と VNC 菌発

育促進因子の探求及び BCYE α の質と VNC 菌検出の関係を調べた。

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。菌株は自家調製の平板培地 BCYE α /BD (Legionella Agar Base 218301, Becton, Dickinson and Company、以下単に BCYE α と略す) を用いて 30℃ で培養し、実験に供した。

2. レジオネラ属菌の水環境における VNC 菌モデル

蒸留水をオートクレーブ後残留塩素濃度が 0.0 mg/L であることを確認し、これを用いて 5mM のリン酸バッファー溶液 (pH 7.1、以下 PB と略す) を調製し

た。300ml容量の滅菌したメディウムボトルに 0.45 μ m フィルターろ過したPBを 200ml入れ、その中に滅菌したスターラーバーも入れたのち密栓し、実験室内で低速スターラー上でゆっくり攪拌が可能な環境を整えた。

BCYE α で3日間培養した菌を 10^{-5} OD となるように無菌的にボトル内 200mlのPBに添加し、密栓して室温ならびに 4°Cで攪拌培養を行った。

菌の生残性は、以下の手順で調べた。培養ボトルのレジオネラ属菌浮遊PBを 100 倍希釈したのち、その 1ml を蛍光染色試薬 LIVE/DEAD BacLight (Thermo Fisher)を添加して蛍光染色を行った。さらにその 0.1mlをポリカーボネートフィルター(0.2 μ m、25mm ϕ 、ADVANTEC)中央にスポット(3-4mm径)しながら吸引ろ過した。十分にフィルターから水分を吸引後、退色防止剤で封入した。FITC 用B励起バンドパスフィルターで蛍光観察を行い、赤色蛍光菌体を死菌、緑色蛍光菌体を生菌としてその数を測定した。

3. BCYE α を用いた VNC レジオネラ属菌の培地発育能回復試験

本研究では、BCYE α あるいは菌体に様々な因子を加えることで VNC レジオネラ属菌が培地発育能を回復するかどうかを試験した。調べた因子としては、VNC コレラ菌等で培地発育能回復の効果が認められているカタラーゼ(ナカライテスク)やピルビン酸Na(ナカライテスク)、また加熱による菌体への物理的刺激、レジオネラ属菌の発育に関わる栄養的因子となっている α ケトグルタル酸(Research Organic)など培地成分、また発育に制約を与える培地pH、そして一般的に細胞内代謝および DNA 増幅に関与するスペルミジン(富士フィルム・和光純薬)などである。pH調整を要する場合はオートクレーブ滅菌前に試験濃度に調整し平板を作製した。加熱で活性を失うようなカタラーゼなどは無菌的にBCYE α 上に所定の濃度溶液 0.1mlを塗布、乾燥後に試験した。単にpHのみの変化は標準BCYE α に対する1NKOHの添加量で調整した。上記のように調整した試験用BCYE α に、ボトル培養したレジオネラ属菌浮遊PBを 100 倍希釈し、その0.1mlを平板に塗布し37°Cで培養した。温度刺激試験は 100 倍希釈したレジオネラ属菌浮遊PBをウォーターバス中で 40-50°Cに加温処理後、試験に供した。培地は培養3-4日後にCFUを測定した。

各試験につき3枚の平板を用い、平均CFUを求めた。

5. メーカーの異なるBCYE α を用いた VNC レジオネラ属菌の培地発育能回復試験

BDのBCYE α に加え、市販されている製品2ブランドのBCYE α 生培地の計3種類のBCYE α を用いて、ボトル培養でVNC化したレジオネラ属菌の発育を比較した。菌の接種および培養条件は4.と同様である。なお市販BCYE α は使用期限3ヶ月前のものを購入し、試験に供した。発育因子としてはカタラーゼ、 α ケトグルタル酸、スペルミジンと4°C培養菌では50°C・5分間の加温処理も因子として加えた。

6. メーカーの異なる寒天試薬で自家調製したBCYE α を用いた VNC レジオネラ属菌の培地発育能回復試験

培地基材の寒天、Agar が培地平板における細菌のコロニー形成に影響することが知られている。そこでBCYE α の成分である寒天以外の条件はすべて同一にして、細菌培地用として市販されている4種類の寒天試薬を用いて、各種寒天による自家調製のBCYE α を作製した。なおYeast ExtractにはBDのBacto Yeast Extract(212750)を使用した。菌の接種および培養条件は4.と同様である。

C. 研究結果

1. レジオネラ属菌の水環境におけるVNC菌モデル

ボトル内PBにレジオネラ属菌を添加した時点をもD0として、その後攪拌培養を継続し、経時的に菌浮遊液を採取し、CFUをモニタリングした。結果を図1に示した。培養開始直後D1のCFUは262、以後室温では100-300CFUの間を推移し、D49時点で224CFUを検出した。培地発育菌数の低下が見られないことから、コレラ菌等での低温培養によるVNC化のデータを参考に、D23の時点で室温培養中の菌浮遊液を100ml滅菌ボトルに移し、4°Cで攪拌培養を開始した。その結果、D35の時点でCFUは83に低下、以後若干の低下を重ねてD49時点で約53cfuまで培地発育菌数は低下した。

ボトル培養中の菌についてBac Lightで生残性を

調べた(図2)。室温培養菌は D21 時点で生菌数は 682cells/ml であった。このときの BCYE α 発育菌数は 247CFU/ml であったことから、生菌数の 36.2%が BCYE α で発育した、即ち、残り 63.8%は VNC 状態と考えられた。一方、4C 培養の菌は D32 時点で測定し、生菌数は 64cells/ml、生菌数は 69CFU/ml であったことから、生菌数のほぼすべてが BCYE α で発育し、VNC 菌としては残存していなかったと考えられた。なお死菌数も生菌数と同時に測定したが、菌体が明瞭に染色で判別できたもののみ測定しており、菌体が死んで変性した状態で染色されていると思われるものについては測定していない。従って測定した死菌数は参考値として記載するに止める(死菌数:室温培養菌 253cells/ml、4C 培養菌 25 cells/ml)

2. BCYE α における VNC レジオネラ属菌の培地発育能回復試験

室温培養菌は D14 以後、4°C培養菌は D32 以後、適時サンプリングし発育試験を行った。培養レジオネラ属菌の培地開発の中で重要な発育因子として見出された α ケトグルタル酸は、通常の 3 倍濃度まで変化させたが大きなCFUの変化は見られなかった(図3)。鉄 Fe は VNC の原因の一つと考えられる活性酸素による酸化ストレスを防ぐ SOD の補酵素であり、VNC 化に関連する可能性を考え通常の 3 倍濃度まで変化させたが CFUには変化がなかった(図4)。培地 pH は VNC の至適pH は通常と異なる可能性を考え、pH6.6~7.8 まで変化させたが、通常のpH6.9 以上にCFUが上昇することはなく、アルカリ側ではCFUの減少が示された(図5)。

カタラーゼ(2000U/plate)、ピルビン酸(0.1%)は VNC 大腸菌での培地発育促進の効果が認められている。カタラーゼは室温培養菌において若干のCFU増加が見られたが、4°C培養菌では対照と比べてCFUの変化は見られなかった(図6)。ピルビン酸は 4°C培養菌に対し、発育促進効果を認めなかった。細胞内代謝活性化、DNA 合成促進につながる可能性のあるスペルミジンは、1mM/plate までCFUに変化はみられなかった(図7)。Yeast RNAも調べた範囲(~50mg/plate)でCFUの変化は見られなかった。

短時間の加熱 Heat shock が VNC コレラ菌の培地発育能回復に関係することから、レジオネラ属菌検査法の中で試料の前処理方法の一つである加熱(50°C)の

条件を 4°C培養菌で試験した。CFUは 5 分間加熱では対照と差がなかったが、15 分間加熱では CFU の減少が示めされた(図8)。

3. メーカーの異なるBCYE α を用いた VNCレジオネラ属菌の培地発育能回復試験

自家調製した BCYE/BD と市販 BCYE α 生培地(A 社ならびに B 社)を用いて、製品による VNC レジオネラ属菌の発育能を比較した。室温および 4°C で培養(D49)したレジオネラ属菌の発育を調べた結果を図9に示した。室温培養菌は自家調製BDの場合、対照では 224CFU であったのに対し、カタラーゼ添加は若干の増加を認めるものの、全体として各因子と対照の間には大差がなかった。一方 A ならびに B 社の場合は BD の結果と比較し、すべての因子について、70-90%の CFU の減少が見られ、BD よりも発育が抑制され

次に 4°C培養菌の場合は、BD の対照が 53 cfu であり、因子間のCFUは室温での結果と同様に大差がなかった。ただし 4°C培養菌でのみ調べた 50C \cdot 5 分間加温条件では、対照より明らかなCFUの減少が認められた。A ならびに B 社の場合は室温培養菌の場合と同様、すべての因子について BD よりも発育が抑制された。図 10には室温ならびに4°C培養したレジオネラ属菌の3種類のBCYE α 対照実験における菌の発育状況を示した。

4. 異なる寒天試薬で自家調製したBCYE α を用いたVNCレジオネラ属菌の培地発育能回復試験

試薬として異なる4種類の市販寒天A~Dを用いて BCYE α を調製し、平板作製後直ちに試験に供した。調製方法は異なるが、対照としてBDのBCYE α を用いた。室温、4°Cともに培養時点 D52 の菌を用いた。

結果を図 11に示したが、室温培養菌の場合は寒天試薬間に若干の発育差が見られた。B ならびに D は 140CFU前後で差がなかったが、A が 125CFUとやや低かったのに対し、C では 84CFUとなり B、D と比較し 40%の減少が見られた。一方 4°C培養菌の場合は、やはり C のCFUが最も低かったものの、全体として大差がなくすべての寒天試薬の結果は 40-60CFUの範囲に含まれた。なお対照として調べた BD の BCYE α の結果は、上記寒天条件

を変えた BCYE α の結果と大差が見られなかった。

D. 考察

大腸菌やコレラ菌は、菌を栄養飢餓状態にする、また低温暴露することで実験的に VNC 状態に誘導できる。本研究では、まずレジオネラ属菌において、このような他菌種と同様な実験的 VNC 化が可能かどうか、水系環境のモデル実験で検証した。

今回の実験では、約 7 週間の室温条件での培養で残存した生菌の中に、BCYE α での発育能を喪失した菌が存在することを確認できた。レジオネラ属菌でも「生きているが (BCYE α では) 培養ができない、発育しない VNC 菌」という存在を、実験的に証明した結果と考えた。このモデルは感染源となりやすい温泉のような高温条件での VNC 菌の特性 (菌数や病原性など) について、重要な情報を提供する有用なモデルになるものと思われる

温度は VNC 菌への誘導因子であり、低温暴露の効果が他菌種で知られている。今回レジオネラ属菌で調べた結果では、4°C で培養したレジオネラ属菌は他菌種の VNC 形態とは異なり、培養不能な VNC 菌には移行せず、死滅に向かうことが示唆された。レジオネラ属菌は環境細菌ではあるが、低温環境はその生残性に対し大きなストレスになっているのかもしれない。寒冷期におけるレジオネラ属菌の野外環境における生態とどのような関係をもつのか、興味深い結果と考えられた。

目に見えない、培養不能なレジオネラ属菌を、どうすれば可視化して、また試料から分離できるのか。本研究では BCYE α を用いた培養をベースとして、この問題を考えた。BCYE α はレジオネラ属菌の細菌学的特性を考慮し開発された、ユニークな培地とされる。発育因子として見つかった α ケトグルタル酸は、実は大腸菌 O157 の VNC 発育回復の因子でもあり、過酸化水素等による酸化ストレスを抑制する作用をもつ。これが BCYE α にも十分含まれているということは、そもそも環境中で酸化ストレスに弱くなりつつも長期生存しているレジオネラ属菌を培養する上で、その抗酸化性が有用と判断された、ということではないかと思われる。

本研究では、 α ケトグルタル酸のような菌発育促進の培地サプリメントを探った。 α ケトグルタル酸も改めて濃度を変え、その効果を調べた。また可能性のある

様々な物質を選択し試験した。結果としては、発育因子といえるものは見つからなかったが、酸化ストレス以外の VNC 化因子、現状ではそれは不明だが、その因子の特性から BCYE α を改良し、VNC 菌を少しでも多く culturable にするという方法論があることを、本研究は示しているものと思われる。その根拠であるが、現在、BCYE α は生培地、また自家調製用粉末培地の形で、多くの企業が製造、市販している。各社製品の品質という点から見れば、かなり多様と考えられる。同一組成の培地間で菌発育性に差があれば、使われる試薬の品質と発育性との関係を知ることができ、培地の改良につながる。

研究期間の都合で今回は市販 2 種類の BCYE α 生培地と BD 社の自家調製用培地を用いた BCYE α について比較試験を行ったが、市販生培地で菌の発育性に大きな低下がみられた。この結果からすれば、調べた 2 種類の市販培地を基準にした場合、既にして自家調製培地は VNC レジオネラ属菌を culturable にする改良型 BCYE α である、と評価することができる。そして何が生菌の発育に促進的あるいは抑制的に作用するのか、これは実験的に証明することは可能と思われる。

今回、細菌のコロニー形成に影響を与えることが知られる寒天、Agar の品質が、レジオネラ属菌の発育性に影響することが明らかとなった。一部の製品ではあるが、発育阻害的な結果が見られたことから、寒天が BCYE α 製品の発育差に関係することが推測され、品質によっては BD 社以上の菌発育を示すものがあることを期待させる結果である。同様に品質に差がありうる Yeast extract も検討の必要があると思われる。

本研究の結果は、VNC 菌とは、レジオネラ属菌に限らず培地によって評価が変わる相対的な存在であり、どのような培地あるいは培養法を基準にするかを含め、議論すべき点があることを示している。さらに現実的な問題として、BCYE α の製品によっては VNC 菌を含むレジオネラ属菌の存在と量を過少評価するリスクの可能性がある、ということも本研究で示されたと考えられる。より多くの生菌を検出する、可視化する (VNC 菌を減らす) ことは、レジオネラ症問題の現状についてのより正確な理解につながる。培地発育能の高い菌 (例えば実験

室培養株)に加え、環境ストレス等で発育能の低下した菌も利用した評価と、それに基づく培養法、培地改良が必要であると考えられる、今後のレジオネラ症問題にその対策が活かされることを期待する。

E. 結論

他菌種で見られる VNC 菌は、レジオネラ属菌においても認められることが明らかとなった。VNC 菌は見えない、分離できない菌であり、これを培地上で発育させることは難しく、現在汎用される BCYE α にも菌発育のサポート力には限界が見られる。さらに製品間で菌の発育性に差があり、培養可能な菌の過少評価にもつながる可能性がある。今後は VNC 菌も含めた培地性能の評価と開発が必要と考えられた。

参考文献

1. Mizunoe Y. et al., Arch Microbiol., 17, 63-67, 1999

2. Mizunoe Y. et al., FEMS Microbiology Letter, 186, 115-120, 2000

3. Wai S.N. et al., FEMS Microbiology Letter, 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

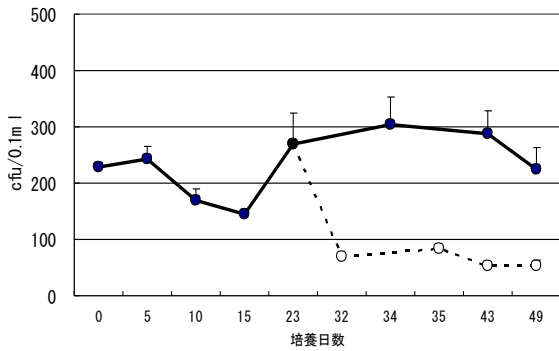


図1、ボトル水系環境におけるレジオネラ属菌の経時的CFUの変動
実践は室温培養、破線は4°C培養

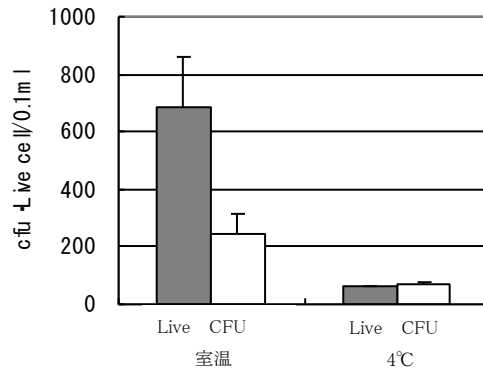


図2、ボトル水系環境での生菌数(Live)とCFU

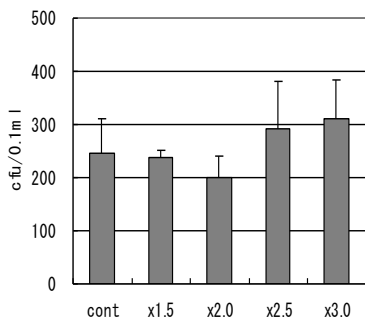


図3. α ケトグルタル酸添加BCYE α における
VNCレジオネラ属菌の発育
菌は室温培養、横軸は対 cont 濃度比

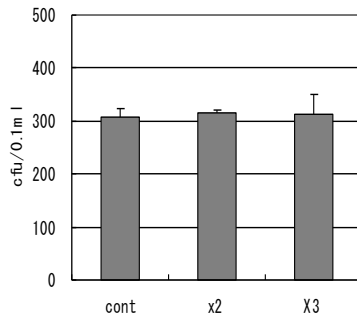


図4. ピロリン酸鉄添加BCYE α における
VNCレジオネラ属菌の発育
菌は室温培養、横軸は対 cont 濃度比

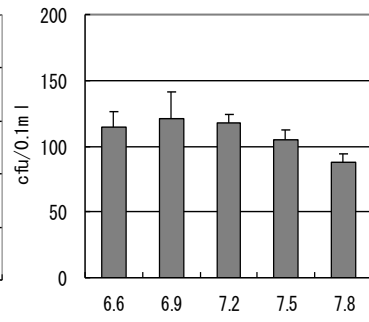


図5. pH調整BCYE α における発育
VNCレジオネラ属菌の
菌は室温培養、横軸は培地pH

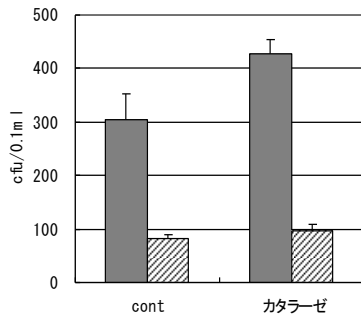


図6. カタラーゼ添加BCYE α における
VNCレジオネラ属菌の発育
■ 室温培養菌、▨ 4°C培養菌
カタラーゼ量は 2000U/plate

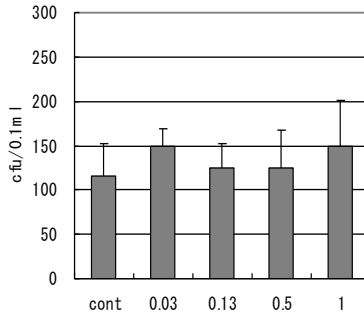


図7. スペルミジン添加BCYE α における
VNCレジオネラ属菌の発育
菌は室温培養、横軸は濃度mM

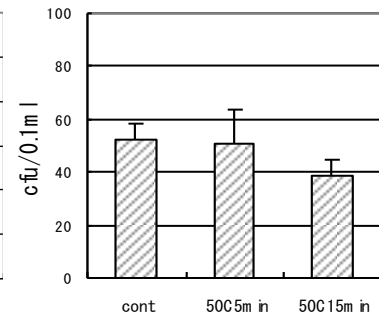


図8. 加温前処理VNCレジオネラ属菌の
BCYE α における発育
菌は4°C培養、横軸は加温条件

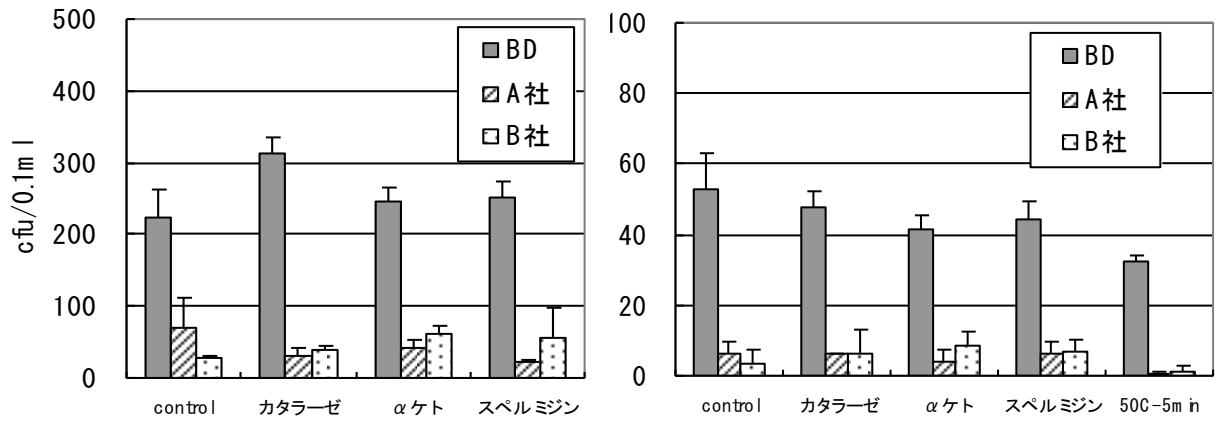


図9. 市販BCYE α 生培地(AならびにB社)と自家調製BCYE α (BD社)におけるVNCレジオネラ属菌の発育
 左図:室温培養菌、右図:4°C培養菌、カタラーゼは2000U/plate、 α ケトグルタル酸は通常の2倍濃度、
 スペルミジンは2mMで使用

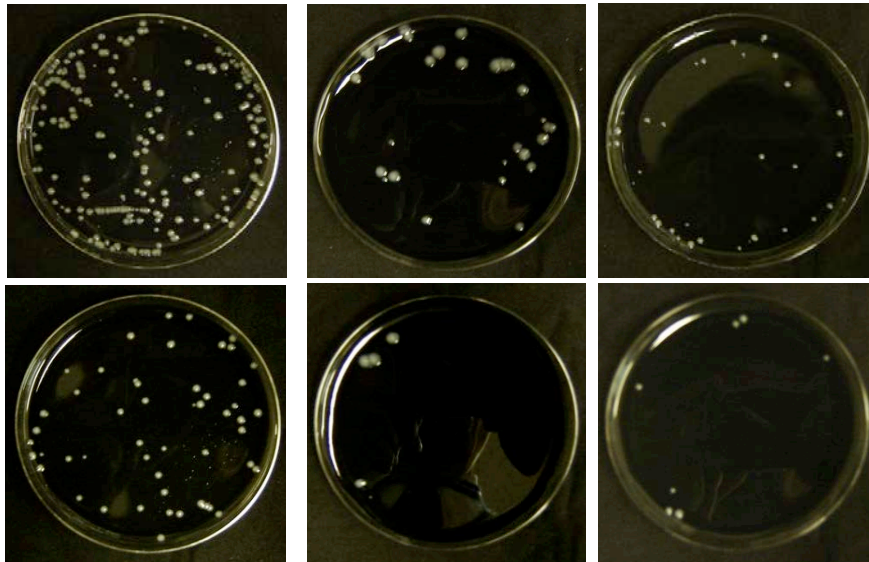


図10. VNCレジオネラ属菌の3種類のBCYE α を用いた対照実験における菌の発育
 左側:自家調製BCYE α (BD社)、中央:A社BCYE α 、右側:B社BCYE α
 上段:室温培養菌、下段:4°C培養菌

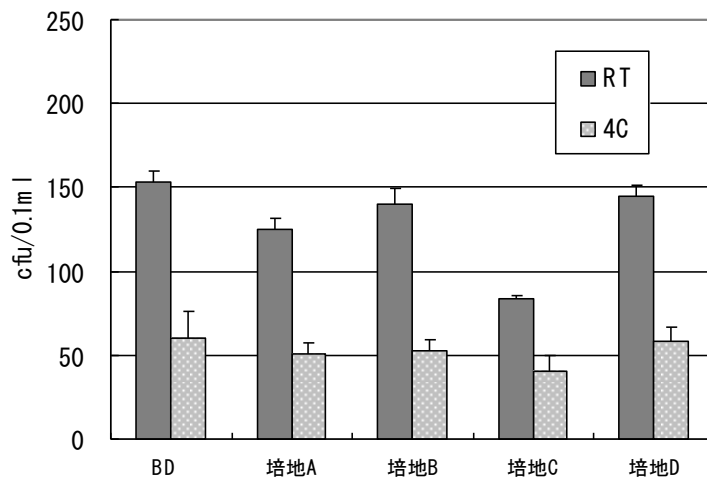


図11. 異なる寒天試薬(A-D)で自家調製したBCYE α を用いたVNCレジオネラ属菌の発育