

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VNC菌のアメーバならびにBCYE αを用いた検出

研究要旨:

1. 高分子多糖類である硫酸化多糖類に含まれるヘパリン、コンドロイチン硫酸およびデキストラン硫酸には、レジオネラ属菌のアメーバ感染促進作用が認められた。
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塩基性アミンのクロロキンならびに塩化アンモニウムはアメーバ感染率を増加させ、取り込まれたVNC菌を生存させる可能性があることが示された。
3. ボトル水系環境を用いたレジオネラ属菌 VNC 菌モデル実験により、水系環境で定量的に VNC 菌の存在を知ることができることを確認した。
4. サプリメントの形 BCYE α のVNC菌発育促進を実現することはできなかったが、BCYE α の培地成分の質を換えることで、VNC 菌培養促進につながる可能性があることが示された。

A. 研究目的

本研究では、通常の培養では検出の困難な環境中のレジオネラ属菌を、生菌として検出する方法を探究した。その一つは、環境中での自然宿主となるアメーバを利用し、菌を取り込ませ増殖させる方法である。高分子糖鎖であるヘパリンを中心とした硫酸化多糖の、アメーバ感染性促進の効果を解析し、また感染後期の段階ですすむファゴソーム形成およびライソゾーム融合に関連して、難培養化した菌が細胞内生存する可能性を検討した。さらに方法論としての汎用性を考慮し、レジオネラ属菌のVNC菌をBCYE αで発育させる培養法を開発するため、実験的なレジオネラ属菌VNC菌のモデルを作成し、それを利用してVNC菌のBCYE αにおける発育条件の解析を行った。

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. アメーバを利用したレジオネラ属菌増殖

1) 試薬類

硫酸化多糖の効果を調べる試薬として、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、ヒアルロン酸を用いた。ファゴソームの活性酸素産生に重要な NADPH オキシダーゼの阻害剤にアポシニン (Apocynin : 4'-Hydroxy-3'-methoxyacetophenone, SIGMA - ALDRICH)を用いた。ライソゾーム融合阻害剤にはクロロキン (Chloroquine diphosphate, SIGMA-ALDRICH) および塩化アンモニウム (NH₄Cl,和光純薬)を用いた。これらの試薬は 10x

Amoeba saline (10xAS) で所定の濃度に調整して用いた。

2) アメーバに対する Lp 感染試験

アメーバ栄養体を 10xAS を用いて 24 ウェルマイクロプレートウェル内にはほぼ単層になるように接着させた。そこに被検物質を含む 10xAS 300 μ l を加え、さらにレジオネラ属菌が 0.01OD になるように加え、30°C で 3 時間培養した。gentamycin を添加し、未感染の菌の不活化、および雑菌汚染を防いだ。所定の培養時間後、氷水上でアメーバを剥離し、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。

4. BCYE α 培地における難培養性レジオネラ属菌の培養

1) レジオネラ属菌 VNC 菌モデル

5mM のリン酸バッファー溶液 (pH 7.1、以下 PB と略す) をフィルターろ過し、その 200ml を滅菌メディウムボトルに入れ、3 日間培養した菌を 10^{-5} OD となるように無菌的に添加し、密栓して室温ならびに 4°C で低速スターラーを用いて攪拌培養した。

菌の生残性は、蛍光染色試薬 LIVE/DEAD BacLight (Thermo Fisher) を用いて、蛍光染色した菌をポリカーボネートフィルター (0.2 μ m、25m m ϕ 、ADVANTEC) 上に吸引固定し、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。

2) BCYE α を用いた VNC レジオネラ属菌の培地発育能回復試験

コレラ菌の VNC 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) などを BCYE α にサプリメントの形で添加した。各種条件で調製した BCYE α にボトル培養したレジオネラ属菌を接種した。またウォーターバス中で 40-50°C に加温処理した菌を、

BCYE α に接種した。培地は培養 3-4 日後に CFU を測定した。

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

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。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 \cdot 5 分間の加温処理も因子として加えた。

C. 研究結果

1. 硫酸化多糖類の効果

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 1 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。一方、ヒアルロン酸 10 mg/ml には明らかに感染率の低下が認められた。培養中のアメーバに形態的な変化は認められなかった。

2. 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

長期培養で発育能が低下した菌に対する、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図 1 および 2 に示した。10xAS を用いた対照実験でアメーバ感染率は 1.3% であったのに対し、アポシニンおよびクロロキンは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。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。図 3 にはアポシニン存在下で感染した菌の細胞内増殖像を示した。取り込み後の増殖に進んでいることがわかる。

3. 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から D0 としたときの、経時的な CFU をモニタリングの結

果を図4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。D23 の時点で室温培養中の菌浮遊液の半量を 4℃で培養を開始した。その結果、D35 の時点でCFUは 83 に低下、D49 時点で約 53cfu まで培地発育菌数は低下した。Bac Light で生残性を調べたところ、室温培養菌は D21 時点で生菌数の 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、4℃培養の菌は D32 時点で、生菌数と発育数ほぼ同じで VNC 菌としては残存していなかったと考えられた(図5)

4. 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℃培養菌は D32 以後、適時サンプリングし発育試験を行った。レジオネラ属菌の一般的培地であるBCYE α の組成成分である α ケトグルタル酸、ピロリン酸鉄は濃度変化に対しCFUの変化はみられなかった。また培地 pHもpH6.6~7.8の間で、通常のpH6.9以上にCFUが上昇する条件はみられなかった。

大腸菌の VNC 菌で発育促進の効果が認められているカタラーゼ、ピルビン酸は、室温培養菌においてカタラーゼに若干のCFU増加が見られたが、4℃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℃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合成促進に関わるスペルミジン、Yeast RNAも調べた範囲でCFUの変化はみられなかった。

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

自家調製した BCYE/BD と市販 BCYE α 生培地(A社ならびにB社)の室温および4℃で培養したレジオネラ属菌(D49)の発育を調べた結果を図7に示した。室温培養菌の場合、自家調製BDの場合、対照と比較して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、対照ならびにすべての因子についてCFUの減少が見られた。4℃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℃培養菌でのみ調べた50℃・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社の場合は対照ならびにすべての因子についてBDよりも発育が抑制された。図8には室温ならびに

4℃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。

D. 考察

環境で生きている微生物を検出する方法には、遺伝子検出法、蛍光染色法そして培養法がある。このうち培養は生菌を回収できる反面、様々な発育条件の制約があり、これが寒天平板培地を用いる *in vitro* 培養の場合、生きてはいるが培養できないVNC菌としてあらわれる。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VNC菌も含めたレジオネラ属菌の存在とその実態を解明することの重要性が増し、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必要と思われる。

本研究期間の中で、まずVNC化している難培養性のレジオネラ属菌をアメーバを用いて検出、分離確保する方法論を検討した。各種の物質の感染促進作用を試験した中で、高分子の硫酸化多糖類が菌の取り込みを促進させること、また菌の取り込み後の細胞内生残および増殖過程において、ファゴサイトーシスにおける活性酸素産生、またファゴリソゾーム形成の各段階を阻害する物質が、菌の生残に有効に働くことを明らかにした。アメーバを用いたレジオネラ属菌、特にVNC菌についても分離、回収可能な方法論が成り立つことが判明したことから、VNC菌の細菌学的な解析およびその野外における実態の解明が進むと思われる。さらに野外試料に関する有用性を明らかにすることが期待される

一方、アメーバを利用したレジオネラ属菌培養は、アメーバそのものの培養や感染実験が必要で、結果に定量性がないという点で汎用性の問題があると思われた。そこで、これまでの知見も応用して一般的に汎用されるBCYE α を用いたVNC菌培養の可能性を検討した。基本としたボトル水系環境を用いたレジオネラ属菌 VNC 菌モデル実験により、水系環境で定量的に VNC 菌の存在を知ることができることを確認した。通常のBCYE α では培養困難なVNC菌を培養で可視化するために、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BCYE α に添加したが、調べた範囲ではVNC菌の発育を促進するものはなかった。しかしBCYE α 製品により菌の発育性が異なることが判明し、培地成分の質がVNC菌培養促進に関与する可能性はであると判断された。一方で現状のBCYE α に基づく検査ではレジオネラ属菌の過少評価につながる可能性があることが想起され

た。

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

現存する微生物のほとんどは培養が困難といわれる。レジオネラ属菌もその中の一つということは、多くの野外調査の結果、また本研究でも実験的に証明されている。レジオネラ症のより正確な理解と対策には、VNC菌も含めたレジオネラ属菌の存在を認識し、適切な方法でこれを検査、測定し、実態を把握し、汚染、感染の防止を図ることが重要と考えられる。

参考文献

1. Ohkuma S et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA, 75(7), 3327-3331,1978
2. Wai S.N.et al., FEMS Microbiol. Lett, 136, 187-191, 1996
3. Mizunoe Y. et al., Arch Microbiol., 172, 63-67, 1999
4. Mizunoe Y. et al., FEMS Microbiology Letter, 186, 115-120, 2000
5. Beuerlein K. Et al., Br.J Pharmacol.,161(4), 885-898, 2010

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 1,000~9,000
	1mg/ml	0.8	

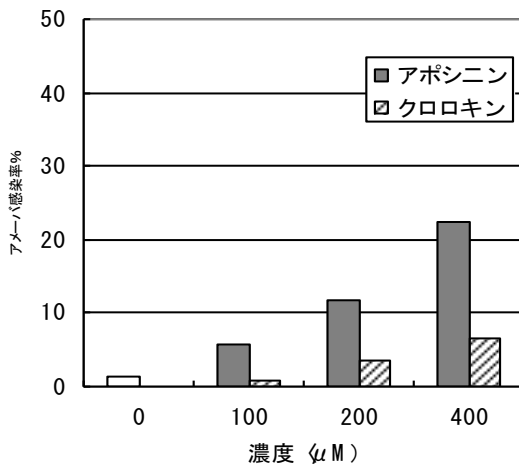


図1、アポシニンならびにクロロキンのレジオネラ属菌アメーバ感染率に及ぼす影響(レジオネラ属菌は培養7日目を使用)

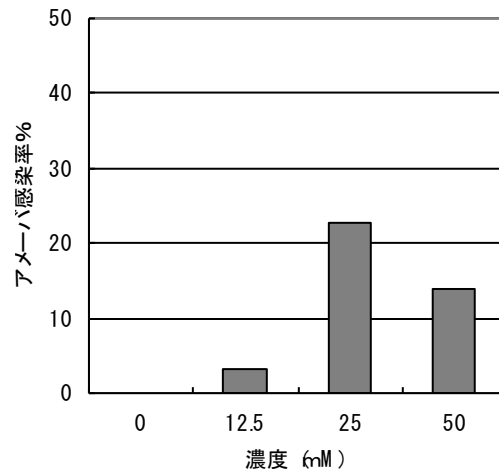


図2、塩化アンモニウム(レジオネラ属菌アメーバ感染率に及ぼす影響(レジオネラ属菌は培養7日目を使用))

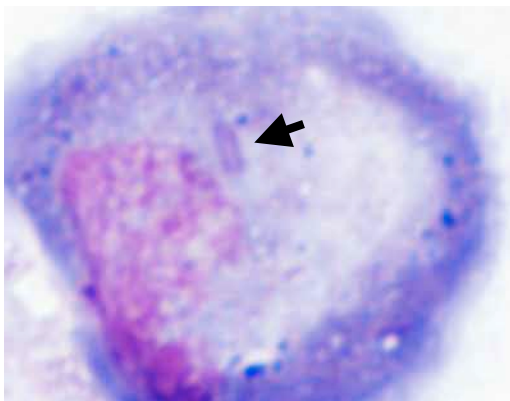


図3、100nM アポシニン添加条件のアメーバ感染で観察されたレジオネラ属菌の細胞内増殖像

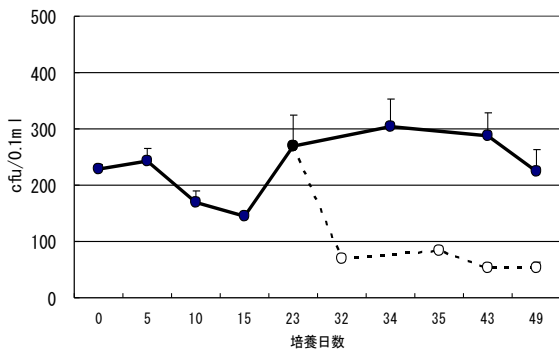


図4、ボトル水系環境におけるレジオネラ属菌の経時的CFUの変動
実践は室温培養、破線は4°C培養

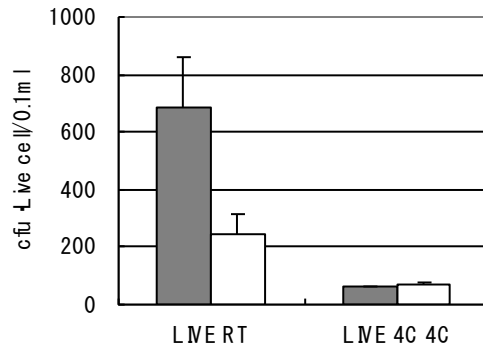


図5、ボトル水系環境での生菌数(Live)とCFU

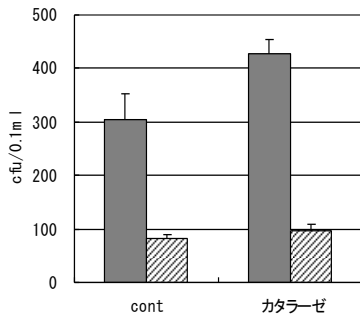


図6、カタラーゼ添加BCYE α における
VNCレジオネラ属菌の発育
■ 室温培養菌、▨ 4°C培養菌
カタラーゼ量は2000U/plate

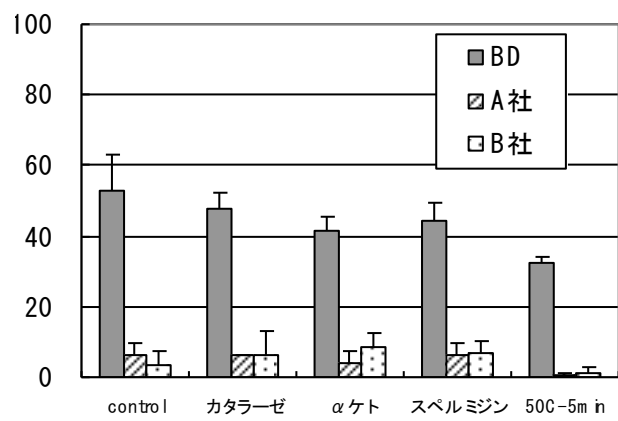
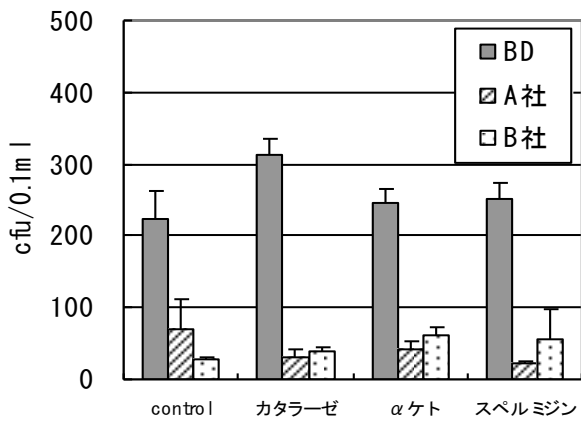


図7、市販BCYE α 生培地(AならびにB社)と自家調製BCYE α (BD社)におけるVNCレジオネラ属菌の発育
左図:室温培養菌、右図:4°C培養菌、カタラーゼは2000U/plate、 α ケトグルタル酸は通常の2倍濃度、
スペルミジンは2mMで使用

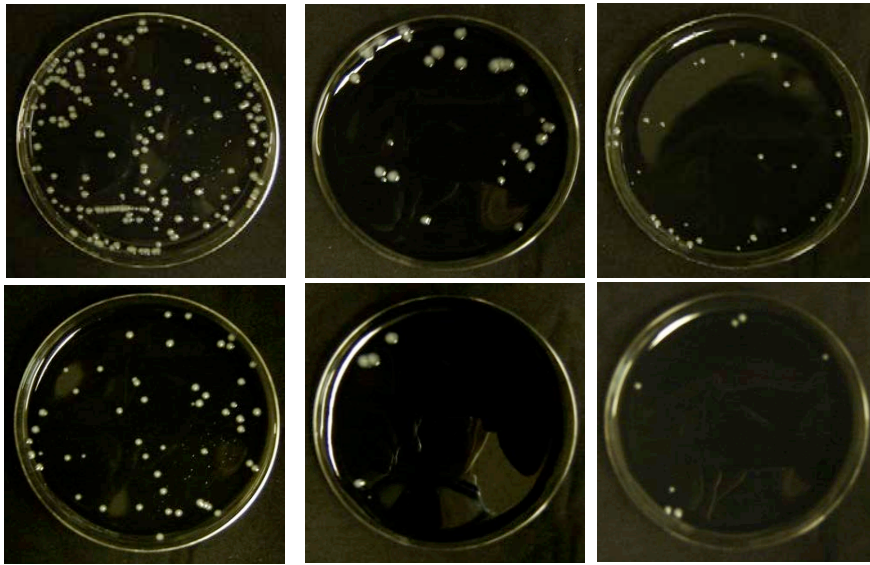


図8. VNClレジオネラ属菌の3種類のBCYE α を用いた対照実験における菌の発育
左側:自家調製BCYE α (BD社)、中央:A社BCYE α 、右側:B社BCYE α
上段:室温培養菌、下段:4°C培養菌