

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24590841

研究課題名(和文) アメーバ共培養法で検出したレジオネラの遺伝子型と棲息環境との関連性解析

研究課題名(英文) Analysis of relationship between genotypes and inhabit environment of Legionella spp. detected by amoebic co-culture method

研究代表者

枝川 亜希子 (EDAGAWA, AKIKO)

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：80321941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アメーバ共培養法を用いて、環境水中のレジオネラ汚染実態の解明を試みた。環境水120試料のうち、アメーバ共培養法とリアルタイムPCR法により91試料(75.8%)が陽性であった。アメーバ共培養法で検出した*L. pneumophila*については、遺伝子型と棲息環境との関連性について解析を行うためにSBT法を試みたが、遺伝子型を特定することができなかった。アメーバ共培養法を行うことにより、17試料(14.2%)で10倍以上の菌数増加が確認され、レジオネラ培養不能菌種を検出した。本研究により、通常の培養法では検出できないが、生存しているレジオネラが環境水中に高率で生息していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study we performed amoebic co-culture method to investigate legionella contamination of environmental water samples. Of 120 water samples, 75.1% (91 samples) were positive for Legionella spp. by amoebic co-culture method combined with real-time PCR method. we performed Sequence-Based Typing to analyze relationship between genotypes and inhibit environment of *L. pneumophila* detected by amoebic co-culture method and mip gene PCR, however we could not obtain positive data. Among the 91 positive samples, 17 samples (14.2%) showed over 10% increase of bacteria numbers. Following sequence analysis found LLAP type such as *L. lytica* from the positive samples. Our results suggested that Legionella spp. including viable but non-culturable form highly inhabited environmental water.

研究分野：環境微生物

キーワード：レジオネラ アカントアメーバ アメーバ共培養法 co-culture 培養不能菌 VBNC LLAP

1. 研究開始当初の背景

近年、レジオネラ症の患者報告数は年々増加傾向にある。レジオネラ感染は、浴槽水や冷却塔水など環境水から発生するエアロゾルに含まれるレジオネラ属菌(以下、レジオネラ)をヒトが吸入することにより発症する。レジオネラ症を防止するためには、感染源となる環境水中のレジオネラの棲息状況を正確に把握し、患者発生時には感染源を迅速に特定することが公衆衛生上重要となっている。

レジオネラ症の原因菌種として最も多い *Legionella pneumophila* は、レジオネラ患者から分離される菌種の90%以上を占めており、環境水中からも高率に検出される。*L. pneumophila* については、抗血清によるスライド凝集反応により血清型別が行われているが、血清群不明の分離菌株が約30%存在するなどの問題がある。そのため、近年、PCRで増幅した遺伝子配列をもとに比較解析を行う Sequence-Based Typing (SBT法) が *L. pneumophila* の型別法として行われるようになった。SBT法による遺伝子型別は、患者発生時の感染源推定の有用な情報として活用されている。しかしながら、これまでのSBT法は、培養法で分離されたレジオネラ菌株のみを対象としており、培養不能、すなわち VBNC (VBNC: viable but non-cultureable) 状態となったレジオネラについてのデータはない。レジオネラの細菌学的特徴として、VBNC状態になる菌種であることや、アメーバ内では増殖するが人工培地では増殖することができない培養不能菌種が存在する。そのため、レジオネラ症防止対策を行うためには、培養法で検出可能なレジオネラだけでなく、これら培養不能レジオネラの棲息状況も把握しておく必要があるが、培養法ではこれらのレジオネラを検出することはできない。

我々はこれまでに浴槽水や給湯水を対象としたレジオネラの分布実態調査を行ってきた。レジオネラの宿主となるアメーバに関する研究も並行して実施し、水道水や水道原水中には種々のアメーバが広く存在し、レジオネラを始めとする細菌増殖に関わっている可能性を明らかにしている。さらに、レジオネラとアメーバが密接に関わっていることに着目し、レジオネラがアメーバ内で増殖することを利用したアメーバ共培養法を用いて棲息実態調査を行った結果、培養法でレジオネラ不検出の浴槽水中に、*L. pneumophila* や培養不能菌種も含むレジオネラが高率に棲息していることを見出した。このような現状から、環境水中のレジオネラの棲息状況を把握するためには、現在主に行われている培養法だけでなく、アメーバ共培養法を用いて VBNC 状態を含むレジオネラ汚染分布実態を明らかにすることが必要となってきている。

2. 研究の目的

種々の環境水を対象にアメーバ共培養法を用いてレジオネラ汚染分布実態を明らかにし、レジオネラ症の最も多い原因菌種である *L. pneumophila* については、遺伝子型と棲息環境との関連性について解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 対象試料

レジオネラ症の感染源となりうる冷却塔水、水景水に加え、水道原水として取水している河川水を対象とし、120試料(冷却塔34試料、水景水31試料、河川水55試料)を採取した。

(2) 環境水からのレジオネラの検出

環境水試料はろ過法による濃縮を行った。直径47mm、孔径0.20 μ mのポリカーボネート製フィルターを用い、ガラス製のファンネルで吸引ろ過した。このフィルターを滅菌精製水が入った遠心管に入れボルテックスミキサーで振盪しフィルター遊離液を得た(100倍濃縮)。得られた濃縮試料は、培養法、リアルタイムPCR法、PCR法、アメーバ共培養法にそれぞれ使用した。

培養法は、レジオネラ症防止指針に記載されている酸処理法、熱処理法によりそれぞれ行った。分離培地にはWY0を用い36 $^{\circ}$ Cで5-7日培養した。培地に発育したレジオネラ様コロニーは、システインの要求性を確認後、菌数を算出した。レジオネラ菌種及び血清群の決定は、レジオネラ免疫血清(デンカ生研)とレジオネララテックスキット(OXOID)により行った。また、必要に応じて16SrRNAを標的とするPCR法を行い、得られたPCR産物について、ダイレクトシークエンス法により塩基配列を解読し、菌種の特定を行った。

リアルタイムPCR法は、CycleavePCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (タカラバイオ)を使用した。DNAの抽出は、QIAamp DNA Mini Kitを用いてキット添付のプロトコール通りに行った。リアルタイムPCR装置はABI PRISM 7900HT Real-time qPCR System (Applied Biosystems)を使用し、キット添付に記載の方法によりレジオネラを検出した。

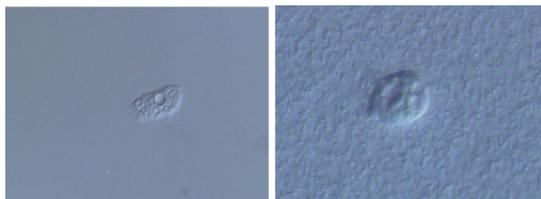
PCR法は、環境水濃縮試料からDNAを抽出し、レジオネラ属菌16srRNAおよび *L. pneumophila* を特異遺伝子である *mip* 遺伝子を標的として行った。

(3) アメーバ共培養による環境水からのレジオネラの検出

アメーバ共培養法には、*Acanthamoeba castellanii* ATCC30234を使用した。PYGC液体培地で前培養した *A. castellanii* を約105 cell/mlに調整し、12wellマイクロプレートに入れ、マイクロプレート底面に貼り付くまで1時間~半日静置した。その後培養液を取り除き、アメーバ用バッファーで静かに洗浄

後、直ちに環境水を過濃縮試料を添加した。30 で7日間培養し、アメーバ共培養法後の試料を得た。これら試料は、リアルタイム PCR 法、レジオネラ属菌 16 srRNA および *mip* 遺伝子を標的とする PCR 法を行った。それぞれの方法は、環境水からのレジオネラ検出と同様に行った。

図1 アメーバ共培養法に使用した *Acanthamoeba castellanii* ATCC30234



(左：栄養体、
右：アメーバ内でレジオネラが増殖)

(4) SBT 法 (Sequence-Based Typing) の検討

SBT 法は、European Working Group for Legionella Infections (EWGLI) が提唱する *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*, の7つの遺伝子の一部領域の塩基配列を決定する方法に従って行った。予備試験として、標準株 *L. pneumophila* ATCC33152 を用いて作成した菌懸濁液について、EWGLI が示す実験条件を用いて遺伝子増幅を行った。また、これら PCR 反応を同時に行うために、Multiplex PCR 法を検討した。Multiplex PCR 法は、QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit (QIAGEN) を用い、キット付属のプロトコル通りに行い、遺伝子増幅を行った。

予備実験で遺伝子増幅を確認した条件を用いて、アメーバ共培養法で検出した *L. pneumophila* について SBT 法を試みた。

4. 研究成果

(1) 環境水からのレジオネラ検出

リアルタイム PCR 法によりレジオネラを検出した試料数を試料種別に表1に示す。試料種別による検出率は、環境水では71.0~76.4%、アメーバ共培養法後の環境水は58.1~83.6%であった。試料全体では、環境水は75.8%、アメーバ共培養法後の環境水は75.0%とほぼ同等の検出率であった。培養法では、水景水3試料からレジオネラを検出したが、河川水及び冷却塔水からはレジオネラを検出しなかった。

レジオネラ属 16S rRNA を標的とした PCR では、環境水は55試料(75.8%)、アメーバ共培養後の環境水試料は54試料(75.0%)が陽性であった。*L. pneumophila* 特異遺伝子である *mip* 遺伝子の検出では、環境水は0試料(0%)、アメーバ共培養後の環境水試料は3試料(2.5%)が陽性であった。

環境水およびアメーバ共培養後の環境水

試料について、いずれかの試料がレジオネラ陽性となったのは、リアルタイム PCR 法は95試料(79.2%)、PCR 法は73試料(60.8%)であった。試料の種別による検出率に大きな差は見られなかった。

表1 リアルタイム PCR 法による環境水からのレジオネラ検出

試料数	Realtime-PCR	
	アメーバ共培養法なし	アメーバ共培養法あり
河川水	55	42 (76.4 %)
冷却塔水	34	27 (79.4 %)
水景水	31	22 (71.0 %)
Total	120	91 (75.8 %)

(2) SBT 法 (Sequence-Based Typing) による遺伝子型別

予備実験として、標準株を用いて SBT 法を実施し、遺伝子増幅の確認を行った。*L. pneumophila* ATCC33152 株のコロニーを TE バッファーに少量懸濁し、99 10 分加熱した菌懸濁液を鋳型として使用した。EWGLI が示す実験条件を用いて遺伝子増幅を行った結果、それぞれのプライマーについて遺伝子増幅が確認できた。Multiplex PCR 法についても同様の方法で行った結果、遺伝子増幅が確認できた。

L. pneumophila 特異遺伝子である *mip* 遺伝子が陽性であった3試料(2.5%)について、SBT 法を試みたが、増幅産物の DNA 量が十分に得られず、遺伝子型の特定には至らなかった。

(3) アメーバ共培養法による菌数増加の確認

環境水およびアメーバ共培養法後の環境水試料について、リアルタイム PCR 法により得られた定量値について比較を行った。アメーバ共培養法を行うことにより、17 試料(14.2%：河川水8試料、冷却塔水1試料、水景水8試料)で10倍以上の菌数増加が確認された。

(4) アメーバ共培養法で菌数増加が認められた試料から検出したレジオネラの菌種同定

アメーバ共培養法により菌数増加が認められた試料について、菌種の同定を行うために、PCR 法とそれに続くダイレクトシーケンシングを行った。その結果、*L. pneumophila*, *L. anisa*, *Legionella* sp. を検出した。また、アメーバに関連する培養不能菌種である *L. rowbothamii*, *L. lytica*, が検出された。

5. まとめ

本研究では、レジオネラがアメーバ内で増殖することを利用したアメーバ共培養法を

用いて、環境水汚染実態の解明を試みた。環境水 120 試料（冷却塔 34 試料、水景水 31 試料、河川水 55 試料）のうち、環境水およびアメーバ共培養後の環境水試料について、いずれかの試料がレジオネラ陽性となったのは、リアルタイム PCR 法は 95 試料(79.2%)、PCR 法は 73 試料(60.8%)であった。試料の種別による検出率に大きな差は見られなかった。実験当初は、アメーバ共培養法で検出した *L. pneumophila* について遺伝子型と棲息環境との関連性について解析を行う予定であった。そのため、予備実験として *L. pneumophila* 標準株を用いて SBT 法の反応条件の確認を行い、その条件で実試料について増幅反応を行った。しかしながら、十分な DNA 量が得られず遺伝子型を特定することができなかった。本研究でのアメーバ共培養法の培養条件は、これまでに行った浴槽水レジオネラ汚染調査と同様に実施したが、今回の結果からは試料のレジオネラ汚染度や種別によって培養条件の検討が必要であると考えられた。

当初予定していた遺伝子型の特定ができなかったことから、アメーバ内増殖能を有するレジオネラの確認とそのレジオネラ菌種の特をを加えて実施した。リアルタイム PCR 法により得られた定量値について、環境水試料とアメーバ共培養後の環境水試料の比較を行った結果、17 試料(14.2%)で 10 倍以上の菌数増加が確認された。アメーバ共培養法で陽性となった試料について遺伝子解析を行った結果、アメーバに関連するレジオネラ培養不能菌種を検出した。

本研究により、通常の培養法では検出できないが、生存しているレジオネラが環境水中に高率で生存していることが明らかとなった。これらの中には、アメーバ増殖能を有し、アメーバに関連するレジオネラ培養不能菌種の存在も確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-kurata T, Adachi S, Furuhashi K and Miyamoto H, Investigation of *Legionella* contamination in bath water samples by culture, amoebic co-culture, and real-time quantitative PCR methods, Int J Environ Res Public Health, 査読有, 2015, 12:13118-13130
doi:10.3390/ijerph121013118

枝川亜希子、木村明生、足立伸一、松島加代、宮本比呂志、アメーバ共培養 - LAMP 法を用いた水景施設におけるレジオネラ属菌生息調査、日本防菌防黴学会誌、査読有、2016、44:11、585-589

[学会発表](計 3 件)

枝川亜希子、木村明生、足立伸一、宮本比呂志、アメーバ共培養 - LAMP 法を用いた水景施設レジオネラ属菌生息調査、日本防菌防黴学会、東京、2016、9 月

枝川亜希子、培養法、アメーバ共培養法、およびリアルタイム PCR 法を用いた浴槽水のレジオネラ汚染調査、第 28 回臨床微生物迅速診断研究会総会、福岡、2016、7 月

枝川亜希子、木村明生、田中榮次、足立伸一、宮本比呂志、アメーバ共培養法を用いた浴槽水中に存在するレジオネラ属菌汚染実態の解明、日本防菌防黴学会、大阪、2015、9 月

6. 研究組織

(1)研究代表者

枝川亜希子 (AKIKO EDAGAWA)

大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部

主任研究員

研究者番号：80321941

(2)研究分担者

木村明生 (AKIO KIMURA)

大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・課長

研究者番号：00250283

河原隆二 (RYUJI KAWAHARA)

大阪健康安全基盤研究所・感染症部

主任研究員

研究者番号：10332454

宮本比呂志 (HIROSHI MIYAMOTO)

佐賀大学医学部・教授

研究者番号：40229894