

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K10039

研究課題名（和文）生活環境中の自由生活性アメーバおよびアメーバ内寄生病原細菌の分布実態と関連性解明

研究課題名（英文）Analysis of relationship between free-living amoebae and amoeba-resistant bacteria in living environment

研究代表者

枝川 亜希子（Edagawa, Akiko）

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・主幹研究員

研究者番号：80321941

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、生活環境（水たまり）に生息するアメーバおよびレジオネラの分布実態を明らかにし、これらの関連性について解明することを目的として行った。アメーバは水たまりに高率で生息し、レジオネラ陽性試料では同時にアメーバが検出された。アメーバ共培養法を用いて水たまり試料とアメーバを共存させると、レジオネラや細菌数の増減、細菌叢の変化が見られ、細菌類の生息にアメーバが関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、水たまり中にアメーバが広く生息していることを明らかにし、アメーバの存在がレジオネラの菌量やその他細菌類の菌叢に影響を与えていることを明らかにした。アメーバを細菌類の汚染指標として活用することにより、感染源特定の一助として活用が可能となる。さらには、アメーバ対策を講じることにより、寄生する病原細菌類の増殖を抑制し、感染症発生の防止に繋がることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：we carried out a survey to determine the prevalence of free-living amoebae and Legionella spp. in environment (puddles), and compared the association of these microorganisms. Free-living amoebae was found at high rates in puddles, and there were detected simultaneously in Legionella-positive samples. The coexistence of amoeba with puddle samples using the amoeba co-culture method showed increases or decreases in legionella and other bacteria counts and changes in the bacterial flora, suggesting the involvement of amoeba in the bacterial population.

研究分野：環境微生物

キーワード：アメーバ 寄生細菌 レジオネラ

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自由生活性アメーバ(以下、アメーバ)は、土壌や水などの環境中に広く生息する原生動物である。これらの多くは非病原性であるが、環境中で病原細菌類の増殖の場となり、感染症の発生に関与していることが明らかになってきた。これらアメーバに寄生して増殖する細菌類は、Amoeba Resistant Bacteria (ARB) と称され、特にレジオネラが公衆衛生上重要である。しかし、日本国内における生活環境中のアメーバの生息状況に関する知見は非常に少ない。そこで本研究では、生活環境に生息するアメーバの生息状況を明らかにするとともに ARB の分布実態を明らかにし、これらの関連性について解明するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、生活環境(水たまり)に生息するアメーバと代表的な ARB であるレジオネラの生息状況を明らかにする。また、純培養したアメーバの中で細菌類を増殖させる手法であるアメーバ共培養法を用いて、アメーバの存在によるレジオネラやその他の細菌類の菌量や細菌叢への影響を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、降雨当日あるいは翌日に採取した水たまり水(n=96)を試料とした。試料の採水時に水温、気温などを測定して記録した。

(1) 水たまり試料からのアメーバおよびレジオネラの検出

アメーバは、ろ過濃縮法によるフィルター貼付の培養法により検出した¹⁾。培養後、検出されたブランクを倒立型位相差顕微鏡で観察し、アメーバが確認されたものを陽性とした。ブランク辺縁部および中心部に精製水を滴下後、ピペティングしてアメーバを含む精製水をスライドガラス上に静置した。微分干渉顕微鏡による観察でアメーバの栄養体やシストを確認し、形態学的な属の同定を行った。

レジオネラは、ろ過濃縮法により試料を 100 倍濃縮し¹⁾、培養法および qPCR 法に用いた。また、濃縮試料の一部はアメーバ共培養法に用いた。培養法では菌数を計測し、菌種および血清群を同定した。分離したレジオネラ株は細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした(約 1500bp) PCR 法とそれに続くシーケンスにより塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、BLAST によってデータベースに登録されている塩基配列との同源性検索を行った。qPCR 法は、濃縮試料から DNA を抽出後、CycleavePCR® *Legionella* 16S rRNA Detection Kit (タカラバイオ) および Applied Biosystems 7900HT fast (Applied Biosystems) を用いてレジオネラを定量した。

(2) アメーバ共培養法を用いたレジオネラの検出

アメーバ共培養法には、*Acanthamoeba castellanii* ATCC30234 を使用した。純培養したアメーバをマイクロプレートに入れ、マイクロプレート表面に貼り付くまで半日程度静置した。その後培養液を取り除き、直ちに濃縮試料とアメーバを 30°C で 5-7 日間共培養した²⁾。アメーバ共培養法後の濃縮試料は DNA を抽出し、qPCR 法や菌叢解析に用いた。また、アメーバ共培養法後の濃縮試料の一部は細菌量の測定に用いた。アメーバ共培養法後の濃縮試料について、濃縮試料と同様に qPCR 法によりレジオネラを定量した。濃縮試料とアメーバ共培養法後の濃縮試料を比較して、レジオネラ菌数の増減を確認した。このうち、アメーバ共培養法を行うことにより qPCR 法のレジオネラ菌数が 1 Log 以上増加した試料について、生きているレジオネラが存在していたと判定し、レジオネラの 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR (386bp) とそれに続くシーケンスによりレジオネラの菌種同定を行った。PCR 増幅産物は、前述のレジオネラ菌株の遺伝子配列決定と同様に行い、遺伝子配列の同源性解析を行った。

(3) 培養法とアメーバ共培養法によりレジオネラ生息が確認された試料の細菌叢解析

アメーバ共培養法でレジオネラ菌数が 1 Log 以上に増加した試料および培養法でレジオネラを検出した試料について、レジオネラの存在比率や細菌叢を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行った。

(4) アメーバ共培養法による細菌数の変化と菌叢解析

濃縮試料およびアメーバ共培養法を行った濃縮試料について、細菌数の定量を行い比較した。qPCR 法には Femto Bacterial DNA Quantification Kit (フナコシ) および Applied Biosystems 7900HT fast (Applied Biosystems) を用いた。アメーバ共培養法を行うことにより qPCR 法のレジオネラ菌数が 5 Log 以上増加した試料について次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行い、アメーバ共培養法による菌叢変化を確認した。

4. 研究成果

(1) 水たまり試料からのアメーバおよびレジオネラの検出

水たまり 96 試料のうち、アメーバは 74 試料 (77.1%) から *Vannella* sp. や *Acanthamoeba* sp. などを検出した (図 1)。レジオネラは培養法により 3 試料 (3.1%) から検出し、これら 3 試料はすべてアメーバも同時に検出された (表 1)。これらの *L. pneumophila* 分離株は、遺伝子配列がすべて同一であった (約 1500bp)。また、BLAST による相同性検索の結果、これらの配列は培養法で検出される主要な *L. pneumophila* と 100% 一致した。qPCR 法によるレジオネラ検出はすべて陽性であり、環境中にはレジオネラ遺伝子が広く存在していた。

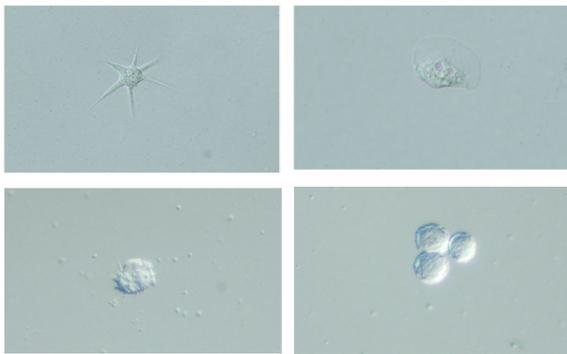


図 1. 水たまりから検出されたアメーバ微分干渉顕微鏡像

上段: *Vannella* sp. (栄養体-floating form, 栄養体-locomotive form)

下段: *Acanthamoeba* sp. (栄養体、シスト)

表 1. 培養法でレジオネラが検出された 3 試料

No.	レジオネラ			アメーバ
	CFU/100mL	菌種	血清群	
1 puddle- 23	10	<i>L. pneumophila</i>	SG2-14	+
2 puddle- 79	10	<i>L. pneumophila</i>	SG1	+
3 puddle- 82	30	<i>L. pneumophila</i>	SG1、8	+

(2) アメーバ共培養法を用いたレジオネラの検出

アメーバ共培養法を行った水たまり 96 試料について、qPCR 法はすべてレジオネラ陽性であった。アメーバ共培養法を行うことにより、10 試料 (10.4%) でレジオネラ菌数の 1 Log 以上の増加が確認された。これら 10 試料について塩基配列の決定および相同性解析を行った結果、5 試料で塩基配列の決定ができ、1 試料が *L. pneumophila*、4 試料が *Legionella* sp. と 99% 一致し、冷却塔や環境水から分離されたレジオネラの塩基配列と高い相同性が得られた。水たまり試料およびアメーバ共培養法後の水たまり試料の qPCR 法によるレジオネラ定量値について、水温、気温および相対湿度との関係性をそれぞれ解析したが、相関性は認められなかった (T-test>0.05)。

(3) 培養法とアメーバ共培養法によりレジオネラ生息が確認された試料の細菌叢解析

培養法でレジオネラを検出した 3 試料、アメーバ共培養法で qPCR 法のレジオネラ菌数が 1 Log 以上に増加した 10 試料について、次世代シーケンサーを用いた 16S rDNA に基づくメタゲノム解析を行った。アメーバ共培養法を行うことにより、*Sphingomonadaceae* や *Flavobacteriales* が増加するなど細菌叢に変化がみられ、アメーバの共存が細菌叢に影響を与えていることが示唆された。また、菌種の多様性は減少傾向を示した。全体の菌叢に対するレジオネラの占有比率はいずれの試料も 0~2.5% 程度であった。

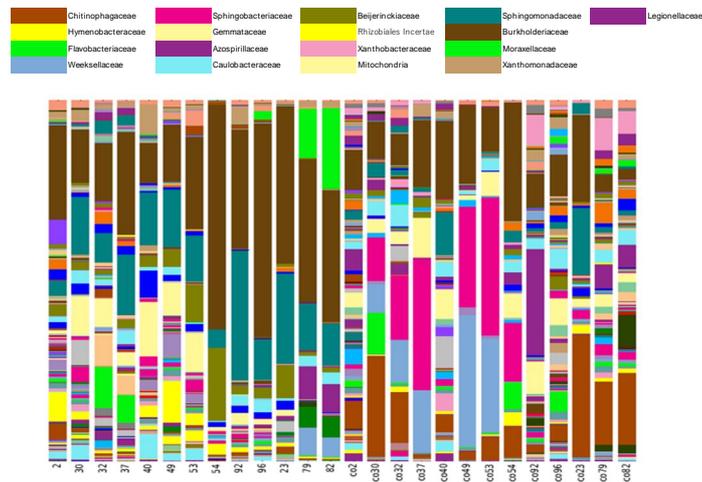
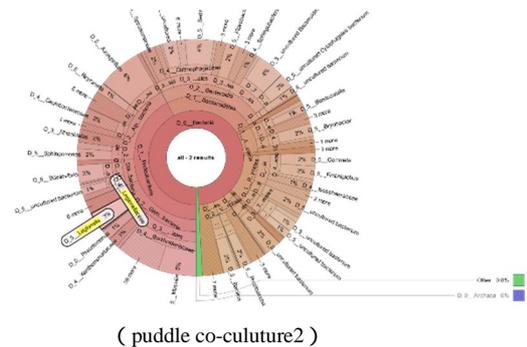


図 2. 培養法およびアメーバ共培養法でレジオネラが検知された試料の細菌叢解析結果

表 2. 全体の菌叢に対するレジオネラの占有比率と細菌叢解析結果の一例

No.	水たまり試料	水たまり試料 + アメーバ共培養法
1. puddle- 2	0.1 %	2.5 %
2. puddle- 30	0.4 %	1.6 %
3. puddle- 32	2.1 %	2.3 %
4. puddle- 37	1.8 %	0.2 %
5. puddle- 40	0.3 %	0.0 %
6. puddle- 49	0.1 %	0.2 %
7. puddle- 53	0.0 %	0.3 %
8. puddle- 54	0.0 %	0.0 %
9. puddle- 92	0.1 %	0.5 %
10. puddle- 96	0.0 %	0.1 %
11. puddle- 23	0.0 %	0.0 %
12. puddle- 79	0.0 %	0.0 %
13. puddle- 82	0.0 %	0.0 %



(4) アメーバ共培養法による細菌数の変化と菌叢解析

環境水濃縮試料を用いた qPCR 法では 1 試料が陰性、95 試料が陽性、細菌量は $1.9 \times 10^5 \sim 1.4 \times 10^{-1}$ ng/L であった。アメーバ共培養法を実施した濃縮試料の qPCR 法では、15 試料が陰性、81 試料が陽性で、細菌量は $5.4 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^{-2}$ ng/L であった。アメーバ共培養法を行うことにより 1 試料が陽性になった一方で、14 試料が陰性になった。アメーバ共培養法を行うことにより細菌量が 1 Log 以上増加した試料は、13 試料 (13.5%) があった。アメーバは水たまりに高率で生息し、レジオネラ陽性試料では同時にアメーバが検出された。このうち、5 Log 以上菌数が増加した 1 試料について菌叢解析を行ったところ、占有比率が 0.04% および 0.1% であった *Chryseobacterium* および *Pedobactor* が、アメーバ共培養法により 37% および 25% と優占種になることが確認された。アメーバ共培養法を用いて試料とアメーバを共存させると、細菌数の増減、細菌叢の変化が見られ、細菌類の生息にアメーバが関与していることが示唆された。

〔文献〕

- 1) 日本建築衛生管理教育センター：第 4 版レジオネラ症防止指針 (2017)
- 2) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル「レジオネラ症」, 19-21 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 枝川 亜希子、余野木 伸哉、宮本 比呂志	4. 巻 92
2. 論文標題 水道水源の河川水におけるレジオネラ属菌と 自由生活性アメーバの生息実態調査	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 水道協会雑誌	6. 最初と最後の頁 2~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34566/jwwa.92.5_2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 枝川亜希子、余野木伸哉、宮本比呂志
2. 発表標題 アメーバ共培養法と培養法によりレジオネラ汚染が検知された水たまりの細菌叢解析
3. 学会等名 第50回日本防菌防黴学会年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 枝川亜希子、余野木伸哉、宮本比呂志
2. 発表標題 アメーバ共培養法による水たまりに生息するレジオネラの検出と菌種同定
3. 学会等名 第49回日本防菌防黴学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 枝川亜希子、宮本比呂志
2. 発表標題 水たまりに生息する自由生活性アメーバの分布実態とアメーバ共培養法によるレジオネラの検出
3. 学会等名 第48回日本防菌防黴学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 枝川亜希子
2. 発表標題 レジオネラ属菌の環境中における生息状況と検出法
3. 学会等名 第48回日本防菌防黴学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 枝川亜希子、木村明生、宮本比呂志
2. 発表標題 水道水源におけるレジオネラ属菌の生息実態と宿主アメーバとの関連性
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 古畑勝則、宮本比呂志、枝川亜希子他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 M'sクリエイト	5. 総ページ数 160
3. 書名 レジオネラ属菌を知る	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	宮本 比呂志 (Miyamoto Hiroshi) (40229894)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------