

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560573

研究課題名（和文）市中レジオネラ感染対策に向けた水系環境温度でのレジオネラとアメーバ相互作用の解明

研究課題名（英文）Study of the interrelationship between *Legionella pneumophila* and free-living amoeba under the condition of natural water temperature to solving legionnaires' disease

研究代表者

大野 章 (OHNO AKIRA)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：40223903

研究成果の概要（和文）：15℃の温度で、*Legionella pneumophila*は*Acanthamoeba castellanii*中で、生きてはいるが培養不能、VNC(Viable but not Culturable)状態に移行することが、培養法、real-time PCR(RTPCR)、EMA real-time PCR(EMA RTPCR)の比較、および透過型電子顕微鏡観察によって明らかになった。しかし*Acanthamoeba polyphaga*,*Haltomannella vermiformis*ではVNCへの移行は示されなかった。一方水温の異なる季節で、東京都内の2つの一級河川を対象に培養法、RTPCR法、EMA RTPCR法を用い*Legionella*の検出を行ったが、*Legionella*は季節に関係なく培養検出できなかった。RTPCR法、EMA RTPCR法では少量ながらも生きて状態で*L. pneumophila*の存在を認めたが、水温による影響は認められなかった。測定地点の河川水中のamoebaについてPCRによる定性を行ったが、*Acanthamoeba*は検出されず、*Haltomannella*が優位であった。この結果は、*Legionella*との相互関係が水温に影響を受けるamoebaの不在か、河川は流れがあり、*Legionella*とamoebaの接触機会が少ないことが原因と考えられた。

研究成果の概要（英文）：It was demonstrated that *L. pneumophila* shifted into a VNC (Viable but not Culturable) mode inside the *Acanthamoeba castellanii* cells at a temperature of 15 degrees C by the combination of cultural method, real time PCR(RTPCR) and EMA treated real time PCR(EMA RTPCR), and by transmission electron microscope observation. On the other hand, the shift into VNC state was not observed in *Acanthamoeba polyphaga* and *Haltomannella vermiformis*. Culturable *L. pneumophila* cells were not detected in periodic survey of river water at fixed-sampling points targeting two major rivers in the Tokyo area. A few viable *Legionella* cells were detected by the combination of RTPCR and EMA RTPCR, however the numbers of viable cells were approximately-same without relation to season. The detection of free-living amoeba (FLA) by PCR showed that the genus *Haltomannella* was predominant in the sampling points and *A. castellanii* was not detected. The absence of FLA species that the interrelationship with *L. pneumophila* is affected by water temperature or few chances to encounter host amoeba by flow of the river might be cause of this result.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：土壌・水環境

1. 研究開始当初の背景

Anandら*L. pneumophila*は、本菌の代表的な寄生宿主である*Acanthamoeba*には20°C培養条件で消化されることを報告し¹⁾、またMoffatらも同様の結果を報告している²⁾。私は、*L. pneumophila* 2菌株を用い、各種温度で*A. castellanii*との捕食寄生関係を調べたところ、20°C以下ではamoeba内で*L. pneumophila*のコロニー形成細胞が急減することを見出し、彼らの報告と同様の結果を得ている。さらに20°C以下では、*Acanthamoeba*の活動は、35°Cよりも活発で*L. pneumophila*の細胞内増殖関連遺伝子群の調節遺伝子*csrA*の発現が低下していることも明らかにした。さらに20°C以下では、amoebaが悪環境で生き抜くためのcyst化を促進することにより*Acanthamoeba*は*L. pneumophila*を積極的に排除している可能性を示した³⁾。このように夏季を除き低い水温の温帯域の自然水環境では、*L. pneumophila*とfree-living amoeba (FLA)との間には、ヒトへの感染すなわち体温35°C-37°Cの条件とは全く異なった細胞間相互関係が存在することが推定された。このことから、自然水環境条件における*L. pneumophila*とFLAの細胞間相互作用を明らかにすることは、環境からのヒトへの*L. pneumophila*感染を制圧する新たな戦略を生み出すための情報をもたらすだろう。このことが本研究の研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

レジオネラ感染予防に対しては塩素消毒を基本とする感染防除指針が策定され実施されてきた。しかし罹患率は一方向に減少せず、むしろ増大傾向にある。*L. pneumophila*の生息場である自然水系は、温帯地域では夏季を除き20°C以下の温度にある。従って有効なレジオネラ感染予防対策の確立には、*L. pneumophila*の自然界での生態生理を詳細に研究することも重要である。本研究の目的は、夏季を除く季節で水温20°C以下にある自然水環境条件での*L. pneumophila*の寄生宿主であるFLAとの相互作用を明らかにし、増大する市中レジオネラ肺炎罹患の危険率を減少させ、レジオネラ感染を予防する安全システムの構築に貢献することにある。

3. 研究の方法

(1) *A. castellanii*と*L. pneumophila*との15°C共インキュベーション後の透過型電子顕微鏡によるamoeba細胞内*Legionella*の観察

A. castellanii ATCC30234および

L. pneumophila Lp01を対象に、既報告に従い実験を行った³⁾。ただしamoebaへの感染菌量はMOI (Multiplicity of Infection) $\times 10$ (10^6 to 10^7) になるようにamoebaけんたく液中に菌を添加した。また実験は滅菌したカバーガラス(直径22mm、厚さ1mm)を12ウェル組織培養用プレートのウェルに沈め、*L. pneumophila*を添加したamoebaけんたく液1mLを加える条件にて行った。

15°Cで3週間インキュベーションした後にカバーガラスを取り出し、2.5%グルタルアルデヒド/2mM塩化カルシウム含有0.1Mカコジル酸中に60分浸漬した。カコジル酸バッファーで洗浄後、1%酸化オスミウムを含むカコジル酸バッファー中で氷冷下30分間後固定を行った。その後氷冷下2%酢酸ウラニウムで30分間染色し、段階濃度によるエタノール脱水後、エポキシ樹脂で包埋した。切片を切り出し、酢酸ウラニウムおよびクエン酸ウラニウムにて染色し、透過型電子顕微鏡(JEOL JEM-1210)を用いて観察した。

(2) 15°C共インキュベーション後の培養法、real-time PCR法(RTPCR)、EMA real-time PCR法(EMA RTPCR)によるamoeba細胞内*L. pneumophila*の生残数測定

従来PCR法による細菌の検出では生菌と死菌の区別がつかなかった。しかしNogvらは、Ethidium bromide monoazide(EMA)が、膜にダメージを負った死菌のみに浸透してDNAに結合し、そこから抽出したDNAをtemplateとするPCRポリメラーゼ反応が阻害される性質を利用したEMA PCR法を考案した⁴⁾。これによってPCRによる生菌と死菌の区別が可能となった。本研究ではEMA RTPCR法を用いて、15°Cインキュベーション下での*Acanthamoeba*および*L. pneumophila*との捕食寄生関係を研究した。

(1)と同様の方法で*L. pneumophila* Lp01を*A. castellanii* ATCC30234に感染させ、15°Cでインキュベーションした。ただし感染はMOI $\times 10$ (10^5 to 10^6)の感染菌量で実施し、15°Cでの共インキュベーションは24ウェル組織培養用プレートにて行った。開始時

(35°Cで共インキュベーション3時間)のamoeba内に侵入した菌数を計測するため、一部ウェルから、cell scraperでamoebaを回収し、滅菌プラスチックチューブに添加した。*L. pneumophila*には影響なく、amoebaのみを破碎するあらかじめ予備検討で得られた条件にて超音波破碎を行った。Amoeba破碎液を培養法、RTPCR法、EMA RTPCR法にてそれぞれamoeba内*L. pneumophila*コロニー形成能細胞数、総ゲノムユニット数(総細胞数に相当)、生菌としてのゲノム数(生きてい

胞数に相当)を計測した。以下方法を述べる。

①培養法

BCYE α 寒天培地に10倍連続希釈したサンプルを10 μ Lずつ滴下し塗り広げた後、35 $^{\circ}$ Cで4日間培養、生じたコロニー数を計測し、amoeba 1x10⁵当たりのamoeba細胞内*L. pneumophila*菌数を求めた。

②RTPCR法およびEMA RTPCR法

EMA5 mgを1mLの超純水にて溶解し12.5 μ Mの濃度になるように、超音波破碎サンプル中に添加、ボルテックスミキサーにて攪拌後暗所、4 $^{\circ}$ Cの条件で5分間氷上に置いた。その後、500 Wハロゲンランプを15 cm離し、20分間、氷冷しながら照射した。処理後、15000回転、8分遠心し、上清を除去した後、滅菌水を1mL添加攪拌し再度遠心した。これを2回行った。遠心沈渣を凍結融解し、その後核酸抽出剤を使用してDNAを抽出し、TE Bufferで溶解、DNA濃度を測定した。RTPCR法にはEMA非処理のサンプルを用いた。定量は、*L. pneumophila* Philadelphia-1の1細胞あたりの既知ゲノム濃度4.3 fg DNA/cellを基準にし⁵⁾⁶⁾、連続10倍希釈にて10⁵から10⁰(Genome Unit GU)に対応する標準曲線用DNA希釈液を作製し行った。

(3) *L. pneumophila* serogroup1 (SG1)の異なる subgroupを対象とした*A. castellanii* ATCC30234との15 $^{\circ}$ Cインキュベーションにおける捕食寄生関係の検討

レジオネラ肺炎の原因菌株*L. pneumophila*のおおよそ90%は血清group1 (SG1)である。SG1はLPS構造中にSG1特異的な抗原決定基を有し、さらにその多型によって10のsubgroupに分かれる⁷⁾。さらに臨床分離SG1株と環境分離SG1株ではそれぞれ優勢なsubgroupが異なる⁸⁾。そこでsubgroupが異なる臨床分離株と環境分離株またATCC株を用い、*A. castellanii* ATCC30234との15 $^{\circ}$ Cでのインキュベーション実験を行い、菌株間で捕食寄生関係に相違が見られるか否か検討した。また使用した菌株は*L. pneumophila*すべての菌株が保持する病原性因子Icm/Dot遺伝子群以外、環境での生残や病原性に関係のある遺伝子(Icm/Dot遺伝子群と補完性のあるlvh遺伝子群、自然環境での生残に関与するとされている65kb pathogenic island)を株特異的遺伝子として保持する。実験は培養法のみで比較した。

(4) *Acanthamoeba polyphaga* および *Hartmannella vermiformis* と *L. pneumophila* Lp01 との15 $^{\circ}$ Cインキュベーション共培養

*Legionella*の自然界宿主として知られる*A. castellanii*以外のFLA *A. polyphaga* ATCC30871 および *H. vermiformis* ATCC 50237を対象に*L. pneumophila*との15 $^{\circ}$ Cインキュベーション共培養実験を行った。方法は培養法だけで行った。

(5) 季節の異なる河川中の*L. pneumophila*の測定

一級河川多摩川、鶴見川を対象に、複数個所を定点として、水温の異なる季節ごとにサンプリングし、培養法、RTPCR法、EMA RTPCR法により*L. pneumophila*の細胞数の水温による影響の調査を行った。

①河川水の採水と処理

多摩川(多摩川駅周辺、二子玉川駅周辺)、鶴見川(綱島駅周辺)の5か所に定点を決め、実施した。サンプリングポイントの物性データとして水温、pH、電導度、ORPを計測し、河川水2Lを採水した。

河川水は200mLずつに分け、除菌用フィルターでろ過した。ろ過後フィルターをはずし、焼いたはさみで裁断し、50mL滅菌チューブに入れ、滅菌水5mLを添加して激しく攪拌しフィルター上にトラップされた微粒子を懸濁した。けんだく液をチューブに移し、10000rpmで10分遠心し、上清4mLを除き、1mLを試料とした。

②培養法および*Legionella*属のPCRによる確認

調製したサンプルに同量の0.2M KCL-HCL buffer (pH2.2)を加え、室温にて10分間静置し、WY0 α 寒天培地に100 μ L接種し、35 $^{\circ}$ Cで5日間培養した。*Legionella*属菌の確認は定法に従った。

*Legionella*属菌が疑われるコロニーに対し16s rRNAをターゲットとしたPCRを行った⁹⁾。*Legionella*属菌と確認されたコロニーについては、レジオネラ免疫血清にて血清群を調べた。

③ RTPCR および EMA RTPCR

実施に対しては、河川水中のPCR反応阻害因子を除去するため、QIAmp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)を使用し調製したサンプルからDNAを抽出した。

④河川水中のFLAのPCRによる検出

*Legionella*属菌の自然界の寄生主要宿主であるFLAの存在をPCRにより検出した¹⁰⁾。

4. 研究成果

(1) 15 $^{\circ}$ Cインキュベーション条件における*A. castellanii*内*L. pneumophila*の survival -透過型電子顕微鏡による観察

電顕TEM像では*Acanthamoeba*細胞内に15 $^{\circ}$ C、3週間インキュベーションでコロニー形成細胞数の消失を確認したにも関わらず(成績には示さない)、*L. pneumophila*細胞が多数消化されずに存在していることが示された(Fig. 1)。Amoeba自体は15 $^{\circ}$ Cで代謝系は活発になっているはずが、なぜ*L. pneumophila*は消化されていないのかこの時点では不明である。一方自然界に見出される*Acanthamoeba*内に、培養不能な様々な細菌が共生細菌として存在することが明らかにされている¹¹⁾。

さらにその中にLLO (Legionella-Like Organism) と呼ばれる培養不能細菌が発見されている¹²⁾。

本研究から *L. pneumophila* が 20°C 以下の条件では *Acanthamoeba* 内にて共生細菌化する過程を踏み出そうとしている可能性も考えられ、コロニー形成能を消失した菌は、amoeba 細胞内で溶菌されないまでも死んでいるのか、生きているのかを知ることが重要と考えた。

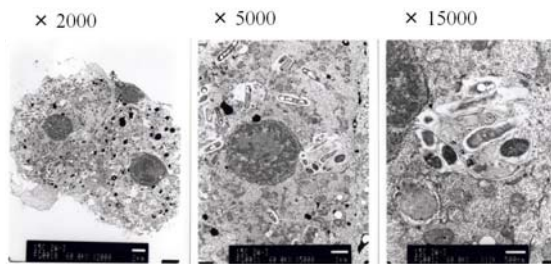


Fig. 1 *L. pneumophila* Lp01 を感染させた後、*A. castellanii* を 15°C で 2 week インキュベーションさせた状態での透視型電子顕微鏡の写真 (撮影: 長崎大学医学部解剖学教室)

(2) 15°C 共インキュベーション後の培養法、RTPCR 法 EMA RTPCR 法による amoeba 内 *L. pneumophila* の生残数測定

結果を Fig. 2 に示した。培養法の結果は以前と同様、3 週目でコロニー形成細胞数は検出限界以下となった。しかし RT PCR の成績は、スタート時のゲノム数が 3 週間目でも維持されており、培養法で示されたコロニー形成数の急減が *Acanthamoeba* 細胞内での溶菌消化による結果ではないことを示した。さらに EMA RTPCR の結果は、*Acanthamoeba* 内にて *L. pneumophila* が生菌の状態、スタート時の菌数を維持していることを明らかにした。

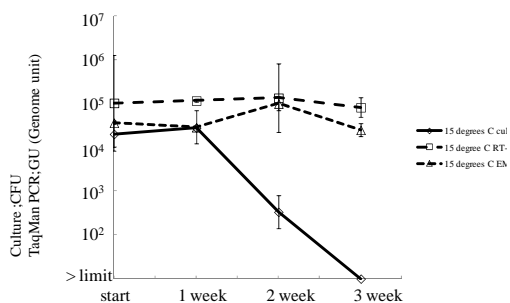


Fig. 2 培養法、real-time PCR 法、EMA real-time PCR 法を用いた、15°C インキュベーション下での *A. castellanii* 内 Legionella 数の計測

15°C インキュベーションで *Acanthamoeba* 内に *L. pneumophila* の多数存在を認めた透視型電子顕微鏡の結果と合わせて考えると、少

なくとも *A. castellanii* 内で 15°C の温度下、*L. pneumophila* は「Viable but Not Culturable: VNC」と呼ばれる、生きた状態で分裂能が低下した生理状態に移行したと推定される。

L. pneumophila の宿主細胞内 VNC 移行に関しては、Smith らは 20°C-22°C で *Tetrahymena vorax* 中の食食胞内で培養能を失いながらも長期にわたり消化されず生きた状態で保持されることを報告している¹³⁾。また Hay らは、*L. pneumophila* SG1 を *A. castellanii* に 35°C で 48 時間感染させた後、*L. pneumophila* を含む amoeba をシスト化させ、さらに再び栄養体に戻すことを繰り返し、その結果、BCYE α 寒天培地で *L. pneumophila* は培養されないが、PCR によって *L. pneumophila* が検出される状態が、36 試験サンプル中 29 サンプル (89%) に認めたと報告した。さらに *A. polyphaga* などの amoeba との共培養でそのうちの 39% で培養能が復活したことを報告した¹⁴⁾

VNC 化が起こるとすれば、特定の *L. pneumophila* 株だけの事象か、あるいは他の amoeba との間でも見られるのかを確認することは重要である。

(3) *L. pneumophila* SG1 の異なる subgroup を対象とした *A. castellanii* ATCC30234 との 15°C インキュベーションにおける捕食寄生関係の検討

臨床分離、環境分離、また subgroup および病原性因子の相違に関係なく、ほとんどの *L. pneumophila* SG1 株において 35°C 感染後の 15°C 移行でコロニー形成細胞数の減少が示された (Fig. 3)。しかし subgroup Allenton の臨床株ではコロニー形成細胞数減少が認められなかった。

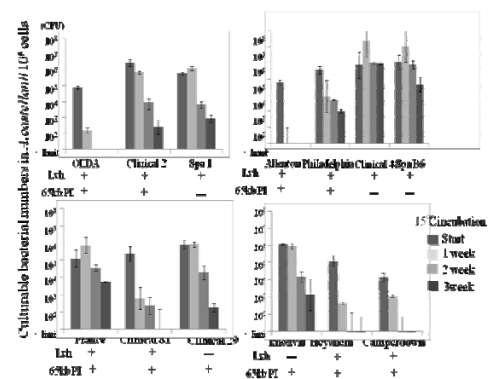


Fig. 3 SG1 subgroup および OGD4, 65kb PI 保有の異なる菌株の amoeba 内 survival

以上の *in vitro* の実験成績から、少なくともほとんどの *L. pneumophila* SG1 subgroup は、夏季以外の水温 20°C 以下の環境において *A. castellanii* 内で増殖することなく、VNC の状態で保持されていることが推定された。

(4) *Acanthamoeba polyphaga* ATCC30871 および *Hartmannella vermiformis* ATCC 50237 と *L. pneumophila* Lp01 との 15°C インキュベ

ジョン共培養

結果をFig. 4 に示した。*L. pneumophila* はインキュベーション1週目で *A. polyphaga* 細胞内で約 62 倍の増殖を認め、また *H. vermiformis* 細胞内では17倍の増殖を認めた。その後は両 amoeba 共に、細胞内の *L. pneumophila* のコロニー形成細胞数は暫減した。この結果は、15°Cにおける amoeba 内での *L. pneumophila* の VNC 化は本研究で調べた限り、*A. castellanii* との間でだけで見られる相互作用であることが明らかとなった。そのメカニズムについては現段階では不明である。

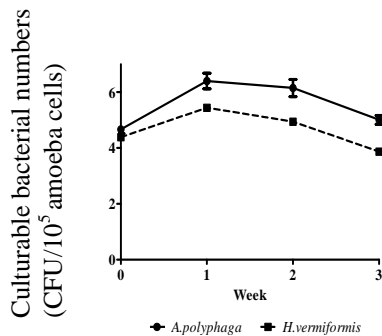


Fig. 4 *A. polyphaga* ATCC30871 および *H. vermiformis* ATCC 50237 と *L. pneumophila* Lp01 との 15°Cインキュベーション共培養

(5) 水温の異なる季節での多摩川および鶴見川における定点サンプリング調査

サンプリング時の各サンプリング河川水の水質、水質をTable 2 に示した。今回調査した東京を代表する1級河川の多摩川および鶴見川において、3月25日の水温はすべて15°C以下であり、8月24日では30°Cを越えている。表には示さないが、培養法では鶴見川で3月25日に *L. pneumophila* が 10¹ CFU/100mL 検出された以外は、すべてのサンプルで *L. pneumophila* を含む *Legionella* spp. は培養非検出であった。一方、RT-PCR、EMA-RT-PCRの成績は、季節水温に関係なくすべてのサンプルで *L. pneumophila* が 10¹ - 10² GU/100mL 存在することを認めた。しかしRT-PCRとEMA RT-PCR間でGU数に有意な差を認めなかった。

Table2 サンプリングポイントの水質

Quality	Tama river A			Tama river B			Tama river C			Tama river D			Tsurumi river		
	3/25	8/15	8/24	3/03	9/24	10/17	3/03	9/24	10/17	3/03	9/24	10/17	3/25	8/15	8/24
Temperature(Degree C)	14	31.6	30.7	12.4	28.8	22.4	12.3	32.2	23.6	11.6	34.1	24.1	15.1	32.1	33.8
pH	8.91	8.17	7.53	8.36	9.24	8.4	8.3	9.18	8.9	8.52	9.25	9.19	7.63	7.34	7.48
ORP*(mV)	242	242	30	182	56	155	205	101	102	216	60	121	179	244	84
Conductivity(mS/m)	26.4	NT**	29.3	29.8	16	14.9	31.3	33.3	14.4	35.2	30.7	32.7	36.7	NT**	39.6

*ORP: Oxidation-Reduction Potential
** NT: Not Test

米国全土 67 の湖、河川を対象にした Fliemans らの調査によれば、すべてで 1L あた

り 10³-10⁷ (幾何級数平均で 9.1 x 10³)¹⁵⁾ の *L. pneumophila* を検出している。山本らは、蛍光抗体法、培養法、PCR法を用い水温が 27-28°C の時期に河川調査を実施し、蛍光抗体法で *L. pneumophila* を 1.2 - 3.5 x 10⁴ 検出、また PCR でも陽性を確認したが、培養法では非検出と報告した¹⁶⁾。Fliemans らは培養法での検出は実施していないが、318 サンプルをモルモットに接種し 47 株を培養で分離、約 15% のサンプル中で *L. pneumophila* が生きていたことを示した。しかし生きていた状態が必ずしも培養能を保持していたかは不明である。なぜならば培養能を失っている VNC 状態であれば、モルモット中で培養能が復帰することが報告されているからである¹⁴⁾。両報告からは、河川中には少なくとも 100mL あたり 10³ 以上の *L. pneumophila* が存在している。本研究では水温に関係なく

L. pneumophila の菌数は RT-PCR 法による検出で 100mL あたり多くて 10² であり、上記報告より菌数は著しく低い。しかし通常蛍光抗体法では偽陽性が排除できないこと、一方で TaqMan RT-PCR は極めて高い特異性があることから本研究における数値が実際の

L. pneumophila の河川中濃度を示しているのかもしれない。培養法は行っていないが、蛍光抗体法にて *L. pneumophila* 多数を認めた 318 サンプルのうち 15% しかモルモットに感染しなかった Fliemans らの成績、および本研究での生菌だけを検出する EMA RT-PCR の成績から、河川中の *L. pneumophila* は VNC 状態か、あるいは生きてはいるが、刺激によっても培養能が復活しない Active but non-culturable 状態にあると推定される。いずれにしろ既報告および本研究の結果を合わせ、河川中からは *L. pneumophila* が培養困難であることは明確な事実である。

しかし一方で、本研究からは、少なくとも水温が高ければ *L. pneumophila* は *A. castellanii* 中で増殖し、20°C 以下であれば VNC 化することを示した。従って 30°C を越える夏場では *L. pneumophila* の河川中の数値は上昇し、水温が 20°C 以下になる秋以降春までは数値が減少することを予想した。しかし調べた限り 1 級河川である多摩川、鶴見川サンプリングポイントにおける *L. pneumophila* の河川中の菌数は、水温に関係なく少ない状態であった。*Legionella* が高頻度に検出されるのは、水温が高くまた細菌を捕食する amoeba が集積し、増殖しやすい多孔質ろ材が充填された循環式ろ過装置を設置した人工環境水である。流れを持つ 1 級河川などの自然水環境は水質にもよるが、細菌が住むに適し、さらに amoeba が入り込める粒子径を持つ小孔を有す粒子の分布密度が低く、従って水温に関係なく、*L. pneumophila* と amoeba の接触機会が低い、すなわち *L. pneumophila* が

生残するには厳しい環境なのかも知れない。一方Fig. 5は、河川中のFLAを確認するPCRの成績である。成績から見る限り *Haltomanella*はすべてのサンプルで検出できたが、*Acanthamoeba*は検出されていない。少なくとも、調べた限り多摩川、鶴見川では *Haltomanella* 優位で *Acanthamoeba*の数は少ないようである。Buseらは、*L. pneumophila*のamoeba内増殖は菌株と、宿主となるamoebaの種類、さらには温度に依存すると報告している¹⁷⁾。*L. pneumophila*の増殖の場としては *Haltomanella*は *Acanthamoeba*に比し、相対的に適していない可能性も考えられた。従って、河川中では *L. pneumophila*はamoeba中に生息するよりも、むしろ菌単体で自由に、あるいはバイオフィルム中に存在し、貧栄養状態でVNC化しているのかも知れない。あるいは一度侵入し、amoeba小胞内で増殖した後小胞ごと吐き出され、小胞中でVNC化し長期存在していることもまた考えられる¹⁸⁾。

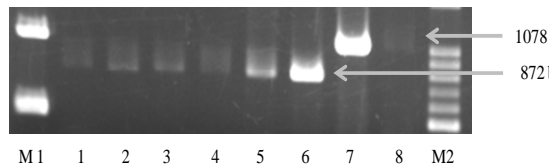


Fig. 5 サンプリング河川水中の PCR による amoeba の検出 1 : 鶴見川, lane 2 : 多摩川 (下流), lane 3 : 多摩川 (上流), lane 4 : 玉川, lane 5 : 中池 lane 6 : Positive control (*H. vermiformis*), lane 7 : Positive control (*A. polyphaga*), lane 8 : Positive control (*A. castellanii*), M1 : 1 kilo base pair marker, M2 : 100 base pair marker

参考文献

- 1) Anand CM., et al. J Hyg (Camb). 1983. 91:167-178
- 2) Moffat JF., et al. Infect Immun. 1992, 60:296-301
- 3) Ohno A., et al. Appl Environ Microbiol. 2008, 74:4585-4588
- 4) Nogva HK., et al. Biotechniques. 2003, 34:804-808, 810, 812-813
- 5) Wellinghausen N., et al. Appl Environ Microbiol. 2001 67:3985-3993
- 6) Levi K., et al. Clin Microbiol Infect. 2003, 9:754-758
- 7) Thürmer A., et al. J Med Microbiol. 2009, 58:588-595
- 8) Harrison TG., et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009, 28:781-791
- 9) Miyamoto H., et al. Appl Environ Microbiol. 1997, 63:2489-2494
- 10) Tsvetkova N., et al. Parasitol Res. 2004, 92:405-413
- 11) Stephan Schmitz-Esser S., Appl Environ

- Microbiol. 2008, 74:5822-5831
- 12) La Scola B., Int J Sys Ev Microbiol. 2004, 54:699-703
- 13) Smith-Somerville HE., et al. Appl Environ Microbiol. 1991, 57:2742-2749
- 14) Hay J., et al., J Appl Bacteriol. 1995, 78:61-65
- 15) Fliermans CB., et al. Appl Environ Microbiol. 1981, 41:9-16
- 16) Yamamoto H., et al. Microbiol Immunol. 1993, 37:617-622
- 17) Buse H.Y., et al. Applied Microbiology. 2011, 53, 217-224
- 18) Bouyer S., et al. Environ Microbiol. 2007, 9:1341-1344

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計1件)

- 1) 大野 章. レジオネラから覗く生物進化 環境微生物の世界. 日本温泉科学会雑誌 査読有、59 巻、2009、179-183,

〔学会発表〕 (計2件)

- 1) Ohno A, Mochizuki H, Kato N, Ishii Y, Tateda K, Suematsu K, Inoue Y and Yamaguchi K. Relationship between *Acanthamoeba castellanii* and *Legionella pneumophila* at a temperature below 20 degree C International Union of Microbiological World of Microbes 2011.9 Convention Center, Sapporo, Japan
- 2) Ohno A, Kato N, Yamaguchi K. Interrelationship between *Legionella pneumophila* and free-living amoeba at a low temperature. The conference LEGIONELLA 2009, 10 Paris, France

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 章 (OHNO AKIRA)
東邦大学・医学部・講師
研究者番号：40223903

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし