

## 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 30 日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790590

研究課題名（和文） アメーバ共培養法を応用した培養不能レジオネラの検出と浴槽水汚染実態の解明

研究課題名（英文） Detection of non-culturable *Legionella* species by amoebal co-culture from bath water samples.

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・研究員

研究者番号：80321941

研究成果の概要（和文）：

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、培養不能レジオネラを含めた浴槽水汚染実態の解明を試みた。浴槽水 71 試料について、アメーバ共培養法を行った後、培養法、PCR 及びリアルタイム PCR 法によりレジオネラ検出を行った結果、63 試料（88.7%）が陽性であった。一方、通常の培養法では 12 試料（16.9%）が陽性であった。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浴槽水中に高率で生息することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the prevalence of non-culturable *Legionella* species in bath water samples using amoebal co-culture. *Legionella* species were detected by amoebal co-culture method from 71 water samples. A total of 63 (88.7%) bath water samples were positive by amoebal co-culture with culture, PCR, and qualitative PCR methods, whereas 12(16.9%) water samples were positive by conventional culture method. Our results suggested that bath water samples were highly contaminated by *Legionella* bacteria including VBNC form.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 総計      | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・公衆衛生学・健康科学

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、浴槽水、培養不能菌、VNC (viable but non-culturable)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、入浴施設の浴槽水を感染源とするレジオネラ症が発生し、公衆衛生上問題となっている。レジオネラ属菌（以下、レジオネラ）は、生存しているが人工培地で培養できない状態（VNC：viable but non-culturable）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。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、現在の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。

レジオネラは現在までの 50 菌種以上が正式に命名されているが、このうち、レジオネラ症患者から分離される菌種の 90%以上を占める *L. pneumophila* が病原性を発揮するうえで重要な性質は、アメーバ内での増殖能と考えられている。そのため、アメーバ内増殖能を有するレジオネラはより強い病原性を有する可能性があり、レジオネラ症の発症につながる危険性も高い。しかしながらわが国においては、浴槽水を対象にアメーバ内増殖能を利用して検出を行うレジオネラの調査研究報告はなく、VNC 状態や LLAP 種を含めたレジオネラの汚染実態及び病原性は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、研究代表者らがこれまでに検討を行ってきた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応用して、日本でのレジオネラ感染源報告が多い浴槽水を対象に、培養不能菌も含めたレジオネラ汚染分布実態を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 浴槽水を対象としたアメーバ共培養法の最適培養条件の検討

アメーバ共培養法を浴槽水試料に適用するために、浴槽水中に存在するレジオネラ以外の微生物を抑制し、かつ、レジオネラとアカントアメーバの増殖に影響を与えない抗生物質などの選択、レジオネラ及びアカントアメーバを効率良く増殖させるための培養液の検討など、最適培養条件の検討を行った。

アメーバは *Acanthamoeba castellanii* ATCC30234 を使用した。純培養したアメーバ約  $10^5$  cell/ml を 12well 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 1 時間～半日静置した。その後培養液を取り除き、直ちにレジオネラ試験菌液を添加した。レジオネラは、*L. pneumophila* ATCC33152 標準株を菌数  $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ cfu/ml に調整し試験菌液とした。レジオネラ標準株を用いたアメーバ共培養法は、アメーバとレジオネラ試験菌液を共培養する co-culture、アメーバとレジオネラ試験菌液に、アメーバを増殖する目的で PYGC 液体培地を添加して共培養する co-culture/PYGC の 2 系列で検討を行った。両方法とも 30°C で共培養し、1、5、7 日後に培養液を B-CYE  $\alpha$  寒天培地に接種し、36°C で 5 日間培養後レジオネラ菌数を計数した。本研究で得られた培養増殖条件を、実際の浴槽水試料に適用するためには、レジオネラ以外の微生物類を抑制するための抗生物質の添

加が必要であることから、抗生物質

(Vancomycin 及び Polymyxin B) を添加してアメーバ共培養法を行い、レジオネラ増殖への影響を検討した。

### (2) 浴槽水からのレジオネラの検出

培養法及びリアルタイム PCR 法によりレジオネラの検出を行った。浴槽水試料はろ過濃縮を行い、浴槽水濃縮試料は培養法、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方法により行った。培養法で検出したレジオネラは、免疫血清による菌種及び血清群の決定を行った。リアルタイム PCR 法は、Cycleave PCR *Legionella* Detection Kit (タカラバイオ) を使用し、キット添付のプロトコール通りに行った。PCR 法は、浴槽水濃縮試料から DNA を抽出し、レジオネラ属菌 16 srRNA を標的として行った。得られた PCR 産物について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を解読し、菌種の特定制を行った。

### (3) アメーバ共培養による浴槽水からのレジオネラの検出

浴槽水濃縮試料について、確立した培養条件を用いてアメーバと共培養する。共培養後の試料は、それぞれ上記と同様に培養法、リアルタイム PCR 法、PCR 法によりレジオネラの検出を行った。

## 4. 研究成果

### (1) アメーバ共培養法でのレジオネラ増殖確認

レジオネラ標準株を用いてアメーバ共培養法の検討を行った。レジオネラ標準株の増殖結果を、図 1 に示す。PYGC を添加してアメーバとレジオネラを共培養することにより、初期菌数が  $10^2 \sim 10^4$ cfu/ml のレジオネラが、7 日後には約  $10^5$  倍に増殖した。一方、PYGC 添加なしでアメーバと共培養したレジオネラは、最も増殖した場合でも 101 倍程度の増殖であった。陰性対照としてアメーバを貼り付けていないマイクロプレートに添加したレジオネラは、7 日後にはすべて不検出であった。以上の結果から、アメーバ共培養においては PYGC を添加して共培養した方が、よりレジオネラが増殖することが明らかになった。また、抗生物質 (Vancomycin 及び Polymyxin B) を添加してアメーバ共培養法を行い、レジオネラ増殖への影響を検討した結果、抗生物質の使用がレジオネラとアメーバの増殖に影響を与えないことが確認されたことから、実際の浴槽水を対象としたレジオネラ検出においてもアメーバ共培養法が適用可能であると考えられた。

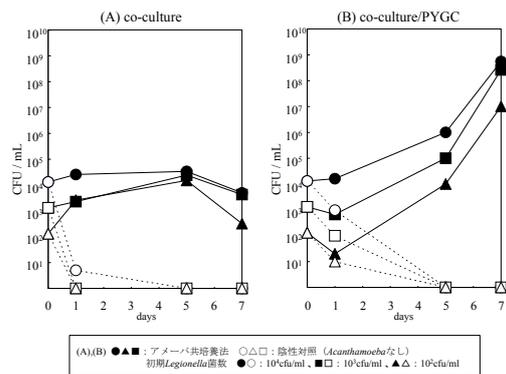


図1 アメーバ共培養法でのレジオネラ増殖確認

(2) 浴槽水からの培養法によるレジオネラの検出

浴槽水から培養法及びリアルタイムPCR法によりレジオネラを検出した結果を表1に示す。入浴施設から採取した浴槽水71試料について、通常の培養法により12試料(16.9%)からレジオネラを検出した。アメーバ共培養法後の試料について、培養法でレジオネラを検出した結果、co-cultureは2試料(2.8%)、co-culture/PYGCは4試料(5.6%)からレジオネラを検出した。アメーバ共培養法の実験室内増殖確認実験においては、co-culture/PYGCが最もレジオネラが増殖する結果が得られていたが、実際の浴槽水では、培地上にレジオネラ以外の微生物類が多数生息し、コロニーをカウントできない試料が多くみられた。そのため、通常の培養法と比較して、アメーバ共培養法後の試料の方が、レジオネラ検出率が低い結果であった。アメーバ共培養法co-culture及びco-culture/PYGCにおいて、培養法又はリアルタイムPCRのいずれかで陽性となった試料は、63試料(88.7%)であった。

表1 浴槽水からのレジオネラの検出

|                            | Without co-culture | With co-culture | With co-culture/PYGC |
|----------------------------|--------------------|-----------------|----------------------|
| positive by culture method | 12 (16.9)          | 2 (2.8)         | 4 (5.6)              |
| positive by realtime-PCR   | 46 (64.8)          | 58 (81.7)       | 47 (66.2)            |
| positive by either methods | 48 (67.6)          | 58 (81.7)       | 47 (66.2)            |

(3) リアルタイムPCR法によるレジオネラの検出

浴槽水71試料について、浴槽水濃縮試料、アメーバ共培養法後の浴槽水濃縮試料について、リアルタイムPCR法によるレジオネラ

検出結果を表1及び図2に示す。浴槽水濃縮試料について定量的にレジオネラを検出した結果、 $1.6 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^7$  cells/L (平均:  $3.8 \times 10^3$  cells/L) 検出した。アメーバ共培養法後の浴槽水濃縮試料については、co-cultureは $1.9 \times 10^2 \sim 1.1 \times 10^{12}$  cells/L (平均:  $2.5 \times 10^4$  cells/L)、co-culture/PYGCは $2.1 \times 10^1 \sim 3.9 \times 10^{10}$  cells/L (平均:  $2.8 \times 10^3$  cells/L)であった。

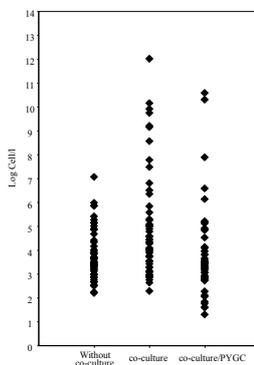


図2 リアルタイムPCR法によるレジオネラの検出

(4) 浴槽水から検出したレジオネラ菌種

浴槽水濃縮試料及び共培養法後の試料から、培養法で検出したレジオネラ菌種は、*L. pneumophila* SG1, 3, 5, 6, 10, NAであった。検出されたレジオネラ菌種は、すべて*L. pneumophila*で、その他の菌種は検出されなかった。PCR産物について、ダイレクトシーケンス法よりの塩基配列を解読し菌種の特定制を行った結果、浴槽水濃縮試料及び共培養法後の試料から、*L. pneumophila*、*L. maceachernii*、Uncultured *Legionella* sp.を検出した。

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、培養不能レジオネラを含めた浴槽水汚染実態の解明を試みた。浴槽水71試料について、アメーバ共培養法を行った後、培養法及びリアルタイムPCR法によりレジオネラ検出を行った結果、63試料(88.7%)が陽性であった。一方、通常の培養法では12試料(16.9%)が陽性であった。本研究の結果より、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浴槽水中に高率で生息することが明らかとなった。これらレジオネラはアメーバ内増殖能を有していることから、病原性を有するレジオネラの浴槽水汚染が示唆された。

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)

[学会発表] (計1件)

レジオネラ属菌を検出するためのアメーバ  
共培養法に関する検討

枝川亜希子、木村明生、田中榮次、足立伸一、  
宮本比呂志、日本防菌防黴学会第39回年次  
大会、2012.9.10-11、東京

6. 研究組織

(1) 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  
研究員

研究者番号：80321941

(2) 研究協力者

木村 明生 (KIMURA AKIO)  
大阪府立公衆衛生研究所・企画総務部・課長

研究者番号：00250283