

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560663

研究課題名(和文) ビルレンス因子を指標とした水道システムにおける感染性レジオネラの定量的検出

研究課題名(英文) Quantitative detection of infectious Legionella spp. in water supply systems using their virulence factors as markers

研究代表者

大河内 由美子 (OHKOUCI, YUMIKO)

麻布大学・その他部局等・准教授

研究者番号：00391079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではレジオネラ属細菌を対象として、THP-1細胞を用いた共培養試験系により感染能変化を調べるとともに、貯水槽水道の滞留給水栓における汚染状況を調査した。L. pneumophilaはシステイン欠乏かつ低栄養状態に曝されると、細胞内生存率が顕著に増大した。また、滞留給水栓の約30%でレジオネラが培養検出され、不検出試料からも再増殖した結果は、VBNC状態のレジオネラが給水系に存在することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：The change of infectivity of Legionella pneumophila was examined using a co-culture system with a THP-1 cell line. The survival of L. pneumophila in THP-1 was drastically increased by L-cystein depletion and by exposure to low organic carbon condition. Also, the contamination with Legionella spp. in water supply systems with cisterns was surveyed. The cultivable Legionella spp. was detected in approximately 30% faucets with stagnant water, and the regrowth was observed in even the samples which cultivable Legionella spp. was undetectable at each sampling. These results suggest that VBNC Legionella reside in water supply systems.

研究分野：水質衛生 環境微生物

キーワード：水系感染症微生物 レジオネラ 感染能 再増殖 残留塩素

1. 研究開始当初の背景

レジオネラは水環境や土壌環境中に普遍的に存在し、浄水処理過程でその一部は物理的に除去されるものの一部は残存し、十分な塩素消毒により不活化された状態で配水されている。一方、水道利用者の不満や不安を背景として、残留塩素濃度を最小化した水道システム構築に関する検討が続けられている。残留塩素濃度の低減は、配水システムにおける微生物再増殖ならびにそれに起因する感染微生物リスクの増大を招く恐れがある。中でも、レジオネラはその健康影響の大きさからリスク管理上優先すべき水系感染症微生物であり、水環境中でのライフサイクルや培養条件の特殊性のため、従属栄養細菌や大腸菌を指標とした現行の微生物モニタリングでは直接的な評価は不可能である。

レジオネラは塩素消毒により比較的容易に不活化され、培養法による検査では不検出となる。しかし、一部は感染能を有したまま VBNC (Viable but non-culturable) 化した状態で水道水中に存在し、宿主細胞共存下では再感染して細胞内で増殖すると考えられている。また、増殖能と感染能が必ずしも一致しないため、現在主流となっている培養検査法では感染性レジオネラの存在量を過小評価している可能性が高い。水道をはじめとした水利用分野においても病原微生物感染リスクの定量的評価が積極的に進められており、“感染能を有するレジオネラ”存在量の把握が急がれる。

2. 研究の目的

本研究ではヒト細胞に対する感染能を指標とした水試料中のレジオネラ定量方法の開発に取り組む。具体的には、1) 貯水槽水道における滞留給水栓を対象とした VBNC 化細胞を含むレジオネラ汚染状況の把握、2) レジオネラ細胞の VBNC 化条件とその感染能評価、3) レジオネラ感染能マーカーとして機能するビルレンス因子の探索と指標としての適用性評価を通して、水環境、特に水道システムにおける感染性レジオネラの存在状況を描出し、水を介したレジオネラ感染リスク評価に資する情報を整備する。

3. 研究の方法

(1) 貯水槽水道における滞留給水栓のレジオネラ属細菌汚染調査

大学キャンパスの貯水槽水道を対象として、使用頻度の低い給水栓から採水し、培養法によるレジオネラ属細菌の検出を試みた。開栓直後の試料 1 L を 0.2 μm メンブレンフィルターを使用して濃縮し、酸処理後に GVPN 培地を用いて 37 °C で 10 日間培養した。生育したレジオネラ様コロニーは、レジオネラ属に共通する 16S rRNA 配列を標的としたコロニー-PCR により判定した。

また、同一試料の残留塩素を中和した後に、密栓して 20 °C のインキュベーター内で 1 週

間静置し、上記と同様の方法で濃縮と酸処理を行った後に、再増殖したレジオネラ属細菌の定量を行った。

(2) レジオネラ細胞の VBNC 化および感染能変化に環境条件が及ぼす影響

培地生育能の変化

モデル微生物として *L. pneumophila* JCM7571 を使用し、低栄養条件が菌株の培地生育能に与える影響を調べた。最終濃度 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL となるよう滅菌水道水および滅菌 PBS を用いて調製した *L. pneumophila* 懸濁液を 4, 20, 37 °C に設定したインキュベーター内に設置し、*L. pneumophila* のコロニー数 (BCYE 寒天培地使用) の変化を経時的に調べた。また、VBNC 状態への移行を調べることを目的として、上記の方法で調製した *L. pneumophila* 懸濁液 37 °C に静置し、経時的に培養可能菌数 (BCYE 寒天培地使用)、生菌数 (CFDA 染色後に蛍光顕微鏡にて計数)、全菌数 (SYTO9 染色後に蛍光顕微鏡にて計数) をそれぞれ測定した。

感染能の変化

ヒト白血病由来細胞 THP-1 を用いたレジオネラ共培養系を用いて、低栄養条件が *L. pneumophila* の感染能変化に与える影響を調べた。初めに、アミノ酸欠乏条件の影響を明らかにするため、*L. pneumophila* を L-システムおよび酵母エキス濃度を变化させた BYE 液体培地を用いて前培養し、集菌・洗菌後に THP-1 細胞への感染実験を行った。また、同様に前培養、集菌・洗菌した *L. pneumophila* をリン酸緩衝液に再懸濁し、10-15 日間放置した試料を用いて感染試験を行った。感染能の評価は、感染直後の THP-1 細胞内細菌数に対する感染 48 時間後の細胞内細菌数の比率 (= 細胞内生存率) を指標として行った。

(3) レジオネラ属細菌の感染能指標遺伝子選定

レジオネラ属の感染能が変化する際に同時に発現量が変化する遺伝子を選定するために、2) の THP-1 細胞への感染試験と平行して *L. pneumophila* 懸濁液から RNA を調製し、文献調査から感染能に関与すると予想される *mip*, *enhC*, *dotA*, *ankh*, *pilE* の各標的遺伝子の特異的に増幅可能なプライマー設計を行った。これらのプライマー対を用いて、逆転写リアルタイム PCR による各遺伝子の発現量を定量した。

4. 研究成果

(1) 貯水槽水道における滞留給水栓のレジオネラ属細菌汚染調査

年間を通じた採水調査の結果、採水直後試料では延べ 57 給水栓試料のうち 17 試料 (陽性率: 29.8%) からレジオネラ属細菌が検出された。その濃度範囲は 100~61900 CFU/L であった。レジオネラ属が検出された同一給水栓を対象に繰り返し採水を行った結果、水温の高い夏季の方が高濃度でレジオネラ属

が検出されること、またいったんレジオネラ属陰性となった給水栓においても、その後再び陽性に転じる現象も確認された。滞留水の排出により残留塩素濃度が回復してレジオネラが一時的に不活化されたとしても、水質条件が再度悪化すれば給水栓内で容易に再増殖が起こると推測される。

一方、再増殖操作後の試料からは 57 給水栓試料中 15 試料（陽性率：26.3%）からレジオネラ属細菌が検出された。採水直後と比較すると、多くの試料ではレジオネラ濃度は低下したが、採水時には不検出だった試料の一部から顕著なレジオネラ再増殖が確認された。この事実から、給水栓水中では塩素消毒により培養法による検査では検出されない状態に移行しているが、死滅しているわけではなく、再増殖操作により VBNC 状態から回復したと推測される。

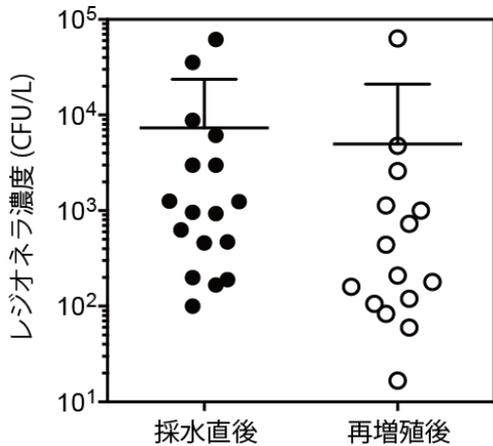


図-1 滞留給水栓試料のレジオネラ濃度

2)レジオネラ細胞の VBNC 化および感染能変化に環境条件が及ぼす影響

培地生育能の変化

低栄養条件下におかれた *L. pneumophila* の培地生育能の経時変化を図-2 に示す。いずれの温度でも最初の 2 日間で $1 \log_{10}$ 以上のコロニー数減少が見られた。37 °C で静置した場合に最も短時間で培地生育能が失われ、23 日後には不検出となった。一方、4 °C、20 °C では不検出となるのに 100 日以上を要した。

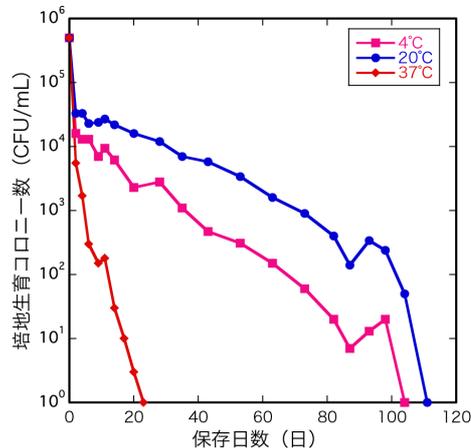


図-2 低栄養条件下における *L. pneumophila* の培地生育コロニー数の経時変化

また、滅菌水道水、滅菌 PBS に懸濁して低栄養条件に曝した *L. pneumophila* 懸濁試料における全菌数、生菌数、および培地生育コロニー数の経時変化を図-3 に示す。PBS、水道水いずれにおいても全菌数には大きな変化が見られなかった一方で、PBS 中の生菌数・培地生育コロニー数は顕著に減少した。14 日後には生菌数が 6×10^3 cells/mL であったにも関わらず、BCYE 寒天培地では不検出となったことから、低栄養条件に長期間曝されることで *L. pneumophila* が VBNC 化する可能性を指摘できる。滅菌水道水中では生菌数は不変、培地生育コロニー数はわずかに減少しており、水道水中に残存するアミノ酸に代表される同化可能有機炭素が 14 日間で枯渇した結果、培地生育コロニー数が減少に転じたと考えられる。

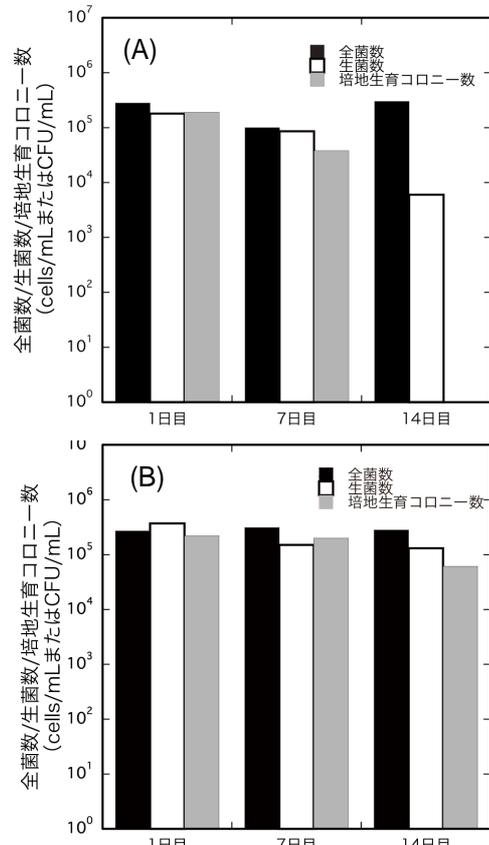


図-3 低栄養条件下(37°C)における *L. pneumophila* の状態変化
(A) 滅菌 PBS 中/(B) 滅菌水道水中

感染能の変化

マクロファージに分化させた THP-1 細胞を用いたレジオネラ共培養系を利用して感染能の変化を評価した結果、前培養に用いる BYE 液体培地中の L-システイン塩酸塩濃度を通常 400 mg/L から順に低減させた場合、特に 100 mg/L 以下の濃度領域で感染 (= THP-1 細胞内侵入) 後 48 時間の細胞内生存率が顕著に増大することがわかった。

続いて、リン酸緩衝液に懸濁した *L. pneumophila* を用いて感染能の経時変化を調べた結果、5 日経過後までは感染能の変化は

見られなかったが、7日経過以降で細胞内生存率が顕著に増大した。

以上の結果を踏まえて、a) L-システイン低含有培地を用いた *L. pneumophila* の前培養、b) 集菌した *L. pneumophila* の低栄養状態への曝露を組合わせて感染能の変化を評価した結果、前培養培地の L-システイン濃度を 25 mg/L に低減し、集菌後に 8 日間低栄養条件に曝した場合に細胞内生存率が約 700% にまで上昇することがわかった。

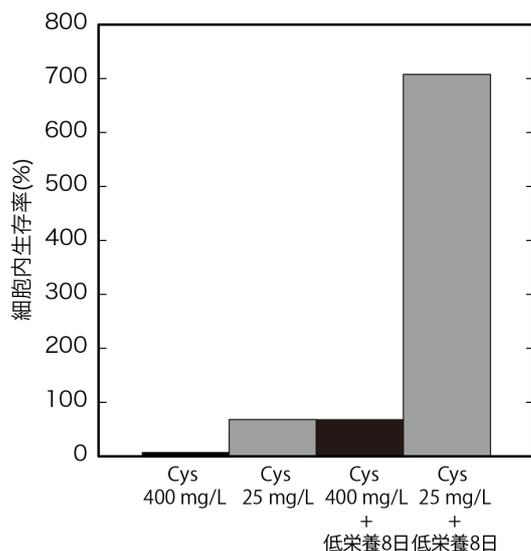


図-4 システイン欠乏および低栄養状態が *L. pneumophila* 感染能に与える影響

3) レジオネラ属細菌の感染能指標遺伝子選定
2) で細胞内生存率の大幅上昇が確認された条件下で培養した *L. pneumophila* を対象として、逆転写リアルタイム PCR により 5 種類の標的配列の定量を試みたところ、*dotA* 遺伝子のみ発現が確認された。ただし、*dotA* 遺伝子の発現量と感染能増強との明確な相関は確認できず、指標遺伝子としての適用は困難であることがわかった。

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 4 件)

- 1) Yumiko Ohkouchi, Satoshi Tajima, Masahiro Nomura, and Sadahiko Itoh: Inflammatory responses and potencies of various lipopolysaccharides from bacteria and cyanobacteria in aquatic environments and water supply systems, *Toxicon*, Vol. 97, pp. 23-31, 2015. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.02.003.
- 2) Yumiko Ohkouchi, Yujiro Yata, Ryota Bun, Sadahiko Itoh: Chlorine requirement for biologically stable drinking water after nanofiltration, *Water Science and Technology: Water Supply*, Vol. 14, No. 3, pp.

405-413, 2014.

- 3) Yumiko Ohkouchi, Bich Thuy Ly, Suguru Ishikawa, Yoshihiro Kawano, Sadahiko Itoh: Determination of an acceptable assimilable organic carbon (AOC) level for biological stability in water distribution systems with minimized chlorine residual, *Environmental Monitoring and Assessment*, Vol. 185, pp.1427-1436, 2013.
- 4) 大河内由美子, 矢田祐次郎, 文亮太, 伊藤禎彦: ナノろ過膜処理を適用した浄水の細菌再増殖特性の評価, 用水と廃水, Vol. 54, No. 12, pp. 39-46, 2012.

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 大河内由美子, 文亮太, 矢田祐次郎, 伊藤禎彦: ナノろ過処理水の微生物再増殖特性に関する研究, 第 63 回全国水道研究発表会講演集, pp. 528-529, 2012.
- 2) Yumiko Ohkouchi, Yujiro Yata, Ryota Bun, Sadahiko Itoh: Chlorine requirement for biologically stable drinking water after nanofiltration, The 9th International symposium on water supply technology Proceedings & Abstracts, pp. 105-106, 2012.

6. 研究組織

(1)研究代表者

大河内 由美子 (YUMIKO OHKOUCHI)
麻布大学・生命・環境科学部・准教授
研究者番号: 00391079