

資料

***Legionella pneumophila* serogroup 1の*Acanthamoeba castellanii*内増殖を用いた高感度検出**

妹尾 正登, 榎 美代子, 小川 博美

Enhanced Detection of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 by Using Coculture Procedure with *Acanthamoeba castellanii*

MASATO SENO, MIYOKO SAKAKI and HIROMI OGAWA

(Received Sep. 30, 2005)

レジオネラがアメーバの細胞内で増殖することを利用して、これまでは検出が不可能であった微量の菌が、検出が可能な量まで増殖するか否か検討した。アメーバは*Acanthamoeba castellanii* ATCC 30234を用いた。レジオネラは環境由来株の*Legionella pneumophila* serogroup 1の2株を用いた。

菌数が(2.3~2.6)×10³ CFU/mlの試料をアメーバとコカルチャーした場合、24, 48, 72時間後の試料中の菌数は、それぞれ約10³, 10⁵, 10⁷ CFU/mlへと増加した。菌数が、2~4 CFU/mlの試料の場合、24時間後の試料中の菌数は十分に検出が可能であった。既存の検査法では検出が困難な1 CFU未満/mlの試料の場合、24時間後の試料では、2株共に検出が不可能であった。しかし、1株は48時間後、もう1株は72時間後の試料で検出が可能となった。アメーバとのコカルチャーはレジオネラの高感度検出に有用と考えられた。

キーワード：レジオネラ, アカントアメーバ, コカルチャー, 細胞内増殖

はじめに

レジオネラ症の原因菌であるレジオネラは、河川や湖沼などの自然環境からだけでなく人工的な環境である空調用冷却塔水、循環式浴槽水、温泉水などからも高率に検出、分離されている[1-3]。この菌は自然界では、水環境中の細菌捕食性原生動物のアメーバなどに寄生し増殖している[4-6]。レジオネラ症患者からの分離株は、*Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) が主体であり、その中でもserogroup 1が多い現状にある[7-11]。

レジオネラの分離は、長時間を要することから、近年は短時間で診断可能な遺伝子検出技術の発達が著しい[12-14]。しかしながら、今なお菌分離は、環境中からのレジオネラの検出では標準的方法であり[15]、臨床材料からの検出においても必要な選択すべき方法である[16]。レジオネラ症の患者が発生した場合には、感染源の特定を迅速に行い感染の拡大を防止することにより、住民の健康被害を未然に防がなければならない。そのためには検査で得られた分離株について、因果関係を探る各種検査を実施し、患者分離株と環境分離株の同一性を明らかにすることが必要となる[17]。その分離株を得るために、レジオネラの高感度な分離法が強く求められている。そこでレジオネラがアメーバの細胞内で増殖する

こと[3]に注目し、試料とアメーバとのコカルチャーを試みることにより、既存の分離方法では検出が困難な微量の菌が、検出が可能な量まで増殖するかどうかを検討した。

材料および方法

供試菌株は、2003年に広島県内の温泉水から分離した*L. pneumophila* serogroup 1の2株(No. 1, No. 2)を用いた。凍結保存された株はBCYE寒天培地(buffered charcoal yeast extract agar; pH 6.9)(BD; Sparks, MD, U.S.A.)で3代継代後、使用した。菌は滅菌蒸留水を用いてMacFarland:0.5濃度の浮遊液に調整後、*Acanthamoeba* buffer[AC buffer; 4 mM MgSO₄, 0.4 M CaCl₂, 0.1% sodium citrate, 0.05 M Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O, 2.5 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM KH₂PO₄; pH 6.5]で希釈して試料とした。

アメーバは、American Type Culture Collection (Manassas, VA, U.S.A.)より入手した*Acanthamoeba castellanii* ATCC 30234 (Lot No. 2248344)を用いた。アメーバは175-cm²の組織培養用フラスコに712 PYG培地[2% proteose peptone, 0.1% yeast extract, 0.1 M glucose, 4 mM MgSO₄, 0.4 M CaCl₂, 0.1% sodium citrate, 0.05 M Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·

6H₂O, 2.5 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM KH₂PO₄; pH 6.5]50 mlを入れ25°Cで1週間培養した。AC bufferで2回洗浄後、新鮮712 PYG培地100 mlに再浮遊し、その50 mlを175-cm²の組織培養用フラスコに入れて25°Cで一晩培養した。アメーバをAC bufferで3回洗浄後、AC bufferで1 × 10⁶ cells/ml濃度に調整した。滅菌ポリプロピレン製15 ml 遠心管に調整アメーバ浮遊液を5 ml入れ、600g、5分間遠心後、上清を吸引除去した。AC bufferで浮遊したレジオネラ試料を5 ml接種し軽く混和後、傾斜状態で30°C、2時間放置した。その後、37°Cで培養した。アメーバに接種した試料は、同時にBCYE寒天培地10枚に各0.1 ml ずつ接種し37°Cで7日間培養後、レジオネラのコロニー数を観察し最初の接種菌量とした。アメーバとコカルチャーした試料を経時的に採取し、AC bufferで10倍段階希釈後、その0.1 mlをBCYE寒天培地に各希釈2枚ずつ接種し、レジオネラのコロニー数を7日後に観察した。

結 果

BCYE寒天培地への0.1 ml接種で10枚中8~9枚が陽性となった試料を、アメーバとコカルチャーした場合のレジオネラの増殖を図1に示した。試料のレジオネラは、最初の菌数は(2.3~2.6) × 10 CFU/mlであった。菌株No. 1, No. 2共に24, 48, 72時間後の試料中の菌数は、それぞれ約10³, 10⁵, 10⁷ CFU/mlへと急激に増加した。

BCYE寒天培地への0.1 ml接種で10枚中1~3枚のみが陽性となった試料を、アメーバとコカルチャーした場合の菌の増殖を図2に示した。最初の菌数は、2~4 CFU/mlであった。菌株No. 2は菌株No. 1に比べ増殖率が低い傾向を示した。

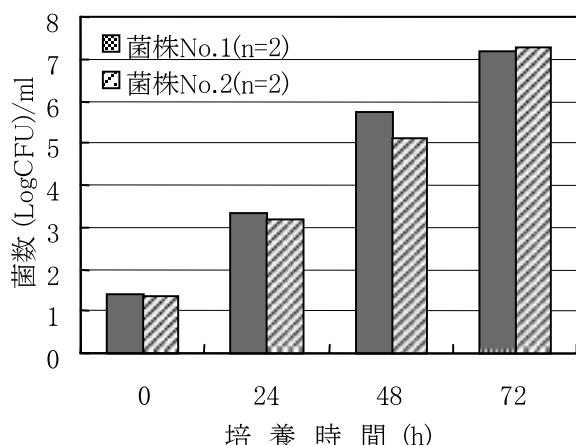


図1 アメーバとコカルチャーによるレジオネラ*の増殖
* : (2.3~2.6) × 10 CFU/ml

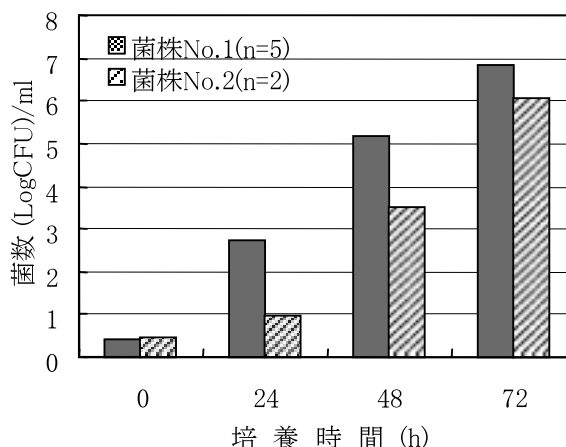


図2 アメーバとコカルチャーによるレジオネラ*の増殖
* : 2~4 CFU/ml

通常の検査では不検出となる1 CFU未満/mlの試料を、アメーバとコカルチャーした場合のレジオネラの検出について表1に示した。最初のこの試料は10枚のBCYE寒天培地に各0.1 mlずつ接種して、全て不検出であった。コカルチャー後24時間後の試料では、菌株No. 1, No. 2共にレジオネラは不検出であった。48時間後の試料では、菌株No. 2は不検出であったが、菌株No. 1の菌数は平均2.72 (LogCFU)/mlに増加し、検出が可能であった。72時間後の試料では、菌株No. 1, No. 2共に検出が可能であった。

表1 1 CFU未満/mlの試料*からのレジオネラの検出

株名	アメーバとコカルチャー後の菌数(LogCFU)/ml		
	24 h	48 h	72 h
No. 1	(-)	2.18	4.75
No. 1	(-)	3.98	5.38
No. 1	(-)	2.00	4.32
平均		2.72	4.82
No. 2	(-)	(-)	3.32
No. 2	(-)	(-)	3.12
平均			3.22

* : 試料1 mlを10枚のBCYE寒天培地に各0.1 mlずつ接種して不検出。
(-) : 不検出。

考 察

レジオネラの生存と増殖にとって自然界では環境中の原生動物が最も重要である[6]。L. pneumophilaの細胞内増殖能は、病原性との関連から研究が推し進められてきた[22-24]。最近この細胞内増殖に関与する遺伝子群が明らかにされ[25, 26]、さらにこれらの遺伝子群は、Acanthamoeba内増殖にも必須な遺伝子であることが明らかとなっている[27]。レジオネラが原生動物のアメーバ内で増殖することを利用して、アメーバを用いた環境水[18, 19]や臨床材料[20, 21]からの菌分離が試みられてい

る。しかし、微量のレジオネラの増殖能について十分に解明されているとは言い難い。

これまでのアメーバ内増殖に関する知見は、レジオネラの菌量が比較的多いものの報告が主体であった[4, 28, 29]。アメーバ内増殖を利用したレジオネラの検出法の確立を一步推し進めるためには、まず微量なレジオネラの増殖の挙動について十分に把握しておく必要がある。今回、実験に用いた分離株はまず(2.3~2.6)×10 CFU/mlの菌量のレジオネラが*Acanthamoeba castellanii*の細胞内で図1に示した如く確実に増殖した。次に2~4 CFU/mlの菌量でも図2に示すように増殖した。この菌量は検体を各0.1 ml接種する検査法[15, 19]では、0.2~0.4 CFU/0.1 mlの菌量であり不検出となる可能性が極めて高いことが推察された。事実、実験開始時点での菌量確認では、いずれの試料も70~90%と高い不検出率であった。しかし、アメーバとのコカルチャーによって24時間後の試料では菌株No. 2が菌株No. 1に比べ増殖率が低いものの、両株共にすでに検出が可能であった。さらに菌量が少なく既存の検査法では検出が困難な1 CFU未満/mlの試料は、アメーバとのコカルチャーによって24時間後の試料では菌株No. 1, No. 2共に検出されなかった。しかし、48時間後の試料では菌株No. 1が、72時間後の試料では菌株No. 2が、確実に検出が可能となった。これらの結果は、接種試料中にレジオネラが存在すればアメーバとのコカルチャーによって、検出が可能となることを強く示唆している。今回供試した分離株は、図2および表1に示す如くアメーバ内での増殖性に差が見られた。アメーバ内の増殖は、レジオネラの株によって差が見られており[28]、また弱毒の株は*Acanthamoeba castellanii*の細胞内で増殖しないことが指摘されている[5]。従って、患者が発生した場合の原因レジオネラは病原性を有することから、この増殖性に関する事象は感染源の追求には影響しないと考えられる。

レジオネラの一部は人工培地では発育できない状態(Viable but Nonculturable: VBNC)にあると言われている[30]。しかし、*L. pneumophila*を実験的に温泉水や水道水中に長期間放置することにより、VBNC状態を作り出し、その菌をアメーバとコカルチャーすることによりアメーバ内で増殖させ、その結果検出が可能となることが明らかにされている[31, 32]。最近、臨床材料からのレジオネラの検出では、迅速性および簡便性から*L. pneumophila*の一部の検出を目的とした尿中抗原検出等のキットが多く用いられる傾向にある[16]。レジオネラ症は*L. pneumophila*による患者が多い[7-11]ことから、その有用性は否めない。しかし、これらはレジオネラの一部のみを検出し、その他のレジオネラを検出できない欠点があり、原因追求の観点から分離培養の併用が望ましい[16, 20]。これらを併せ考えると、レジオネラのア

メーバ内増殖を利用した検出法は、検出感度が上がるばかりでなくVBNC状態のレジオネラをも検出可能であり、臨床材料および環境材料からのレジオネラの検出に極めて有用であると考えられる。

文 献

- [1] Brooks, T., Osicki, R.A., Springthorpe, V.S., Sattar, S.A., Filion, L., Abrial, D., Riffard, S. (2004): Detection and identification of *Legionella* species from groundwaters. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 67, 1845-1859.
- [2] Nakamura, H., Yagyu, H., Kishi, K., Tsuchida, F., Ohishi, S., Yamaguchi, K., Matsuoka, T. (2003): A large outbreak of Legionnaires' disease due to an inadequate circulating and filtration system for bath water-epidemiologic manifestations-. *Intern. Med.*, 42, 806-811.
- [3] Winn, W. C., Jr. (1999): *Legionella*. In: Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C., Tenover, F. C., Tenover, R. H. (Eds.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp. 572-585.
- [4] Cirillo, J. D., Falkow, S., Tompkins, L. S. (1994): Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect. Immun.*, 62, 3254-3261.
- [5] Moffat, J. F., and Tompkins, L. S. b (1992): A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.*, 60, 296-301.
- [6] Rowbotham, T. J. (1980): Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.*, 33, 1179-1183.
- [7] Doleans, A., Aurell, H., Reyrolle, M., Lina, G., Freney, J., Vandenesch, F., Etienne, J., and Jarraud, S. (2004): Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 458-460.
- [8] Helbig, J. H., Bernander, S., Castellani Pastoris, M., Etienne, J., Gaia, V., Lauwers, S., Lindsay, D., Luck, P. C., Marques, T., Mentula, S., Peeters, M. F., Pelaz, C., Struelens, M., Uldum, S.A., Wewalka, G., Harrison, T. G. (2002): Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 21, 710-716.
- [9] National Institute of Infectious Diseases of Japan (2003): Legionellosis, April 1999-December 2002,

- Japan. Infect. Agents Surveill. Rep., 24, 27-28.
- [10] Reingold, A. L., Thomason, B. M., Brake, B. J., Thacker, L., Wilkinson, H. W., Kuritsky, J. N. (1984): *Legionella* pneumonia in the United States: the distribution of serogroups and species causing human illness. J. Infect. Dis., 149, 819.
- [11] Yu, V. L., Plouffe, J. F., Pastoris, M. C., Stout, J. E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C. M., Paterson, D. L., Cheresky, A. (2002): Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired Legionellosis: an international collaborative survey. J. Infect. Dis., 186, 127-128.
- [12] Buchbinder, S., trebesius, K., Heesemann, J. (2002): Evaluation of detection of *Legionella* spp. In water samples by fluorescence in situ hybridization, PCR amplification and bacterial culture. Int. J. Med. Microbiol., 292, 241-245.
- [13] Declerck, P., Verelst, L., Duvivier, L., Van Damme, A., Ollevier, F. (2003): PCR as a test for the presence or absence of *Legionella* in (cooling) water. Water Sci. Technol., 47, 103-107.
- [14] Rantakokko-Jalava, K., Jalava, J. (2001): Development of conventional and real-time PCR assays for detection of *Legionella* DNA in respiratory specimens. J. Clin. Microbiol., 39, 2904-2910.
- [15] Bartie, C., Venter, S. N., Nel, L. H. (2003): Identification methods for *Legionella* from environmental samples. Water Res., 37, 1362-1370.
- [16] Murdoch, D. R. (2003): Diagnosis of *Legionella* infection. Med. Microbiol., 36, 64-69.
- [17] Jonas, D., Meyer, H.-G. W., Matthes, P., Hartung, D., Jahn, B., Daschner, F. D., Jansen, B. (2000): Comparative evaluation of three different genotyping methods for investigation of nosocomial outbreaks of Legionnaires' disease in hospitals. J. Clin. Microbiol., 38, 2284-2291.
- [18] Fallon, R. J., Rowbotham, T. J. (1990): Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to *Legionella micdadei* associated with use of a whirlpool. J. Clin. Pathol., 43, 479-483.
- [19] Sanden, G. N., Morrill, W. E., Fields, B. S., Breiman, R. F., Barbaree, J. M. (1992): Incubation of water samples containing amoebae improves detection of Legionellae by the culture method. Appl. Environ. Microbiol., 58, 2001-2004.
- [20] La Scola, B., Mezi, L., Weiller, P. J., Raoult, D. (2001): Isolation of *Legionella anisa* using an amoebic coculture procedure. J. Clin. Microbiol., 39, 365-366.
- [21] Rowbotham, T. J. (1983): Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. J. Clin. Pathol., 36, 978-986.
- [22] Cianciotto, N. P., Eisenstein, B. I., Mody, C. H., Toews, G. B., Engleberg, N. C. (1989): A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. Infect. Immun., 57, 1255-1262.
- [23] Dowling, J. N., Saha, A. K., Glew, R. H. (1992): Virulence factors of the family *Legionellaceae*. Microbiol. Rev., 56, 32-60.
- [24] Yamamoto, Y., Klein, T. W., Newton, C. A., Widen, R., Friedman, H. (1988): Growth of *Legionella pneumophila* in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages from A/J mice. Infect. Immun., 56, 370-375.
- [25] Segal, G., Shuman, H. A. (1998): How is the intracellular fate of the *Legionella pneumophila* phagosome determined? Trends Microbiol., 6, 253-255.
- [26] Vogel, J. P., Isberg, R. R. (1999): Cell biology of *Legionella pneumophila*. Curr. Opin. Microbiol., 2, 30-34.
- [27] Segal, G., Shuman, H. A. (1999): *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. Infect. Immun., 67, 2117-2124.
- [28] Neumeister, B., Schöniger, S., Faigle, M., Eichner, M., Dietz, K. (1997): Multiplication of different *Legionella* species in Mono Mac 6 cells and in *Acanthamoeba castellanii*. Appl. Environ. Microbiol., 63, 1219-1224.
- [29] Wadowsky, R. M., Wilson, T. M., Kapp, N. J., West, A. J., Kuchta, J. M., States, S. J., Dowling, J. N., Yee, R. B. (1991): Multiplication of *Legionella* spp. in tap water containing *Hartmannella vermiformis*. Appl. Environ. Microbiol., 57, 1950-1955.
- [30] Hussong, D., Colwell, R. R., O'Brien, M., Weiss, E., Pearson, A.D., Weiner, R. M., Burge, W. D. (1987): Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. Bio/Technology, 5, 947-950.
- [31] Ohno, A., Kato, N., Yamada, K., Yamaguchi, K. (2003): Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. Appl. Environ. Microbiol., 69, 2540-2547.
- [32] Steinert, M., Emödy, L., Amann, R., Hacker, J. (1997): Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. Appl. Environ. Microbiol., 63, 2047-2053.