

レジオネラ属菌の病原性に関する基礎的検討

Fundamental Studies on pathogenicity of Legionella spp.

古畑勝則, 山本静雄, 鈴木 潤

麻布大学大学院環境保健学研究科

Katsunori Furuhata, Shizuo Yamamoto, Jun Suzuki

Graduate School of Environmental Health, Azabu University

Abstract: As part of an epidemiological study of legionellosis, we investigated the growth within *Acanthamoeba* sp. of 62 strains of *Legionella* spp. isolated from surface soils nationwide in 2001.

All strains tested grew in *Acanthamoeba* sp., suggesting that the strains were pathogenic. The minimum bacterial number required for the growth in the amoeba was 10^3 - 10^8 CFU/ml and there were differences between the strains. The above findings suggested that all soil-derived strains were pathogenic.

序 文

レジオネラ属菌は土壌などの自然環境に広く生息しているといわれ、これらが空調用冷却塔や浴槽などの人工的水環境に侵入すると推察される。ここで増殖したレジオネラ属菌がエアロゾルとして飛散することによりヒトに感染し、肺炎などの呼吸器系疾患を起こすものと考えられている。近年、入浴施設における集団発生が相次ぎ¹⁾、その感染源対策が急務とされている。

そこで、著者らは上述のことを踏まえ、レジオネラ属菌の生態学的研究の一環として、わが国の表層土壌における本菌の生息状況を調査した²⁾。その結果、レジオネラ属菌は北は北海道から南は九州、沖縄まで全国各地の道端や公園など身近な土壌からほぼ一年を通して分離された。土壌から分離されたレジオネラ属菌はそのほとんどが *L. pneumophila* であり、なかでも血清群1群が優占種であった²⁾。これらは臨床材料から高頻度に分離される菌種と同一であ

ることから、レジオネラ症の原因菌として重要であると考えられる。しかし、土壌由来株については病原性などに関して十分に検討された報告はほとんどみられない。

今回は、レジオネラ症の原因解明の一助として、土壌由来株の病原性をアメーバ内増殖性の有無によって評価した。

材料および方法

1. 供試菌株

2001年に全国の表層土壌から分離同定したレジオネラ属菌62株を用いた²⁾。その内訳は *L. pneumophila* 血清群1群22株、同血清群2群1株、同血清群3群13株、同血清群5群および6群がそれぞれ7株、*L. anisa* 1株、*L. bozemanii* 2株、*L. feeleii* 3株、*L. oakridgensis* 2株、*L. saintelensis* 4株であった。また、臨床由来株は東邦大学医学部から分与していただいた6株を用いた。その内訳は *L. pneumophila* 血清群1群3株、同血清群3群、同血清群5群、同血

清群6群が各1株であった。

成績

2. 0.65 % NaCl 感受性試験

0.65 % NaCl 含有 BCYE α 寒天培地を作成し、これと BCYE α 寒天培地 (対照) の両者に McFarland No. 1 に調整した供試菌液をそれぞれ各 5 μ l ずつ接種し、36 $^{\circ}$ C で 3 日間培養後、発育の有無を観察した。

3. アメーバ内増殖性試験

アメーバ内増殖性試験は、宮本らによって考案されたアメーバ寒天法³⁾に従って行った。すなわち、BCYE α 寒天培地 (日研生物医学研究所) の表面を十分乾かした後、これに PYGC 培地⁴⁾で 30 $^{\circ}$ C 7 日間培養した *Acanthamoeba* (JAC/E1 株, 国立感染症研究所より分与) 液を 3 ml 滴下し、培地表面全体に塗抹した。30 $^{\circ}$ C で 3 時間静置し、アメーバを寒天平板に十分に付着させた後、余分な PYGC 培地を除去した。この培地 (アメーバ寒天培地と称す) と BCYE α 寒天培地の両者に供試菌を同時に接種し、30 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。これら両培地でコロニー形成を観察された供試菌株はアメーバ内増殖性を有するものと判断した。さらに、増殖した菌株を *Acanthamoeba* 液に接種して 18 時間感染させた後、ヒメネス染色を行い、アメーバ内で増殖したレジオネラ属菌を観察して細胞内増殖能を確認した。なお、陽性コントロールには臨床分離株である *L. pneumophila* Nagasaki 80045 株、陰性コントロールには弱毒株である *L. pneumophila* 25D 株⁵⁾をそれぞれ用いた。

また、アメーバ内増殖に要する菌数を把握するために以下のように行った。すなわち、上記と同様に培養した *Acanthamoeba* 液を 2 ml ずつ小試験管に分注し、これに McFarland No. 2 となるように調製した菌液を 10 倍段階希釈後、その 0.1 ml をそれぞれ接種した。これを 30 $^{\circ}$ C に 7 日間放置後、各試験管から 1 白金耳量を取り、BCYE α 寒天培地に画線塗抹し、36 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。平板上のコロニー形成を観察し、供試菌が発育した場合はアメーバ内で増殖したものと判定した。なお、アメーバを含まない PYGC 培地のみを対照とした。

1. 土壌由来レジオネラ属菌の NaCl 感受性

供試菌株はいずれも BCYE α 寒天培地には良好に発育したが、0.65 % NaCl 含有 BCYE α 寒天培地上では集落形成が不十分であったことから、明らかに NaCl 感受性であることが認められた。

2. 土壌由来レジオネラ属菌のアメーバ内増殖性

すべての供試菌株は陽性コントロールと同様にアメーバ寒天培地上でも集落を形成し、対照として用いた BCYE α 寒天培地上の集落となんら差は認められなかった。従って、これらの供試菌株はいずれも *Acanthamoeba* の細胞内で増殖したものと考えられた。このことはレジオネラ属菌をアメーバに感染させた後のヒメネス染色によっても明瞭に確認された。

3. 土壌由来レジオネラ属菌のアメーバ内増殖に要する最小菌数

土壌由来レジオネラ属菌がアメーバ内で増殖した最小接種菌数を Table 1 に示した。対照として用いた PYGC 培地のみではレジオネラ属菌はまったく発育しなかったことから、集落を形成した菌株はアメーバ内で増殖したものと判断した。アメーバ内増殖に要した菌数は菌株によって大きく異なり、最小は 10^3 CFU/ml であったが、最大は実験最高菌数の 10^8 CFU/ml と 5 log の差があった。なかでも最も菌株数が多かったのは 10^5 CFU/ml の 16 株 (25.8 %)、ついで 10^6 CFU/ml が 14 株 (22.6 %) であった。これを *L. pneumophila* の血清群別にみると、1 群は 10^5 CFU/ml が 14 株 (63.6 %) と最も多く、次に 10^5 CFU/ml 以下の比較的少ない菌数で増殖した。ところが、3 群は 10^6 CFU/ml が 5 株 (38.5 %) と最も多く、次に 10^8 CFU/ml が 4 株 (30.8 %) と比較的多い菌数を必要とした。*L. pneumophila* 以外の菌種においても同様な傾向がみられ、実験最高菌数の 10^8 CFU/ml が 5 株 (41.7 %) と最も多く認められた。また、5 群と 6 群は、特に顕著な傾向は認められず、 10^3 CFU/ml から 10^8 CFU/ml にほぼ等しく分布していた。また、同時に行った臨床由来株では、1 群の傾向に類似しており、 10^5 CFU/ml 以下の比較的少ない菌数で増殖した。

Table 1 Minimum bacterial numbers of soil isolates *Legionella* spp. required for the growth within *Acanthamoeba* sp.

| <i>Legionella</i> spp. tested | serogroup | Number of isolates positive (%) | | | | | | Total |
|-------------------------------|-----------|---------------------------------|---------|----------|----------|---------|----------|---------|
| | | Bacterial No. (log CFU/ml) | | | | | | |
| | | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| <i>L. pneumophila</i> | 1 | 4(8.2) | 1(4.5) | 14(63.6) | 2(9.1) | 1(4.5) | 0(0) | 22(100) |
| <i>L. pneumophila</i> | 2 | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 1(100.0) | 0(0) | 0(0) | 1(100) |
| <i>L. pneumophila</i> | 3 | 1(7.7) | 2(15.4) | 0(0) | 5(38.5) | 1(7.7) | 4(30.8) | 13(100) |
| <i>L. pneumophila</i> | 5 | 1(14.3) | 2(28.6) | 1(14.3) | 1(14.3) | 1(14.3) | 1(14.3) | 7(100) |
| <i>L. pneumophila</i> | 6 | 1(14.3) | 1(14.3) | 1(14.3) | 2(28.6) | 1(14.3) | 1(14.3) | 7(100) |
| <i>L. anisa</i> | ND | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 1(100) | 1(100) |
| <i>L. bozemanii</i> | ND | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 1(50) | 0(0) | 1(50) | 2(100) |
| <i>L. feeleii</i> | ND | 0(0) | 1(33.3) | 0(0) | 1(33.3) | 1(33.3) | 0(0) | 3(100) |
| <i>L. oakridgensis</i> | ND | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 2(100) | 2(100) |
| <i>L. sainthelensis</i> | ND | 0(0) | 2(50.0) | 0(0) | 1(25.0) | 0(0) | 1(25.0) | 4(100) |
| Total | | 7(11.3) | 9(14.5) | 16(25.8) | 14(22.6) | 5(8.1) | 11(17.7) | 62(100) |

考 察

レジオネラ属菌はこれまでに40種を超える菌種が報告されている。これらの分類学的な基準種をみると、1) 臨床材料から分離されたもの、2) 最初環境から分離されたが、のちにヒトに病原性があることがわかったもの、3) 環境から分離され、ヒトに病原性があるかどうか不明なもの三つに大別される⁶⁾。また、*L. pneumophila*は同じ菌種でも臨床的には肺炎型を示すもの、あるいは熱型を示すものがある。このようにレジオネラ属菌の病原性に関しては十分に解明されておらず、現時点ではレジオネラ属菌はすべて病原性があると考えられている⁷⁾。

レジオネラ属菌の細菌学的特徴の一つに通性細胞内増殖性がある。すなわち、レジオネラ属菌は細菌捕食性原生動物の細胞内でも増殖する性質を有する。このことは本菌がヒトや動物のマクロファージ内でも増殖できることと共通する。そしてこの性質がヒトにおける病原性を考える上で最も重要であるといわれている⁶⁾。さらに*L. pneumophila*のマクロファージを殺す細胞傷害活性は、NaCl感受性と相関していることが明らかにされている^{8,9)}。

このような背景から今回は土壌由来株を対象に、レジオネラ属菌の病原性に関する検討を行うにあたり、最初に0.65% NaCl感受性によりスクリーニングを行ったところ、供試菌株はすべて感受性を示し、病原性を有することが示唆された。次に、*Acanthamoeba*を用いて分離株の細胞内増殖能を調べ

たところ、土壌由来株は臨床由来株と同様に*Acanthamoeba*内で増殖することが明らかになった。このことから、これらの分離株はマクロファージ内でも増殖可能であると考えられ、供試菌株はいずれも病原性を有するものと推察された。また、アメーバ内増殖に必要な菌数を調べたところ 10^3 CFU/mlから 10^8 CFU/mlと菌株によって大きな差異が認められた。この値が病原性の強弱とどのような関係にあるのかはまったく不明であるが、菌株による病原性の差を反映しているのかもしれない。臨床材料からの分離頻度が最も高い*L. pneumophila*血清群1群では他の血清群に比べて臨床由来株同様、比較的少ない接種菌数でもアメーバ内増殖が認められた。

伊藤¹⁰⁾は臨床由来株と環境由来株を対象にリムルテストによるエンドトキシン活性を比較検討したが、両者に相違を認めていない。しかしながら、マウスを用いた感染実験においては、環境由来株でも臨床由来株と同程度の病原性をもつ株と病原性が極めて弱い株が存在することを明らかにしている。既述したように、アメーバ内増殖に必要な菌数は菌株によって大きく異なったことから、土壌由来株においても株間で病原性に差異がある可能性が示唆された。また、アメーバ内増殖に多くの菌数を必要とした*L. anisa*や*L. oakridgensis*などに関しては、*Acanthamoeba*が自然界での宿主でないことを示しているのかもしれない。今後、菌株数を増やして検討する必要があると考えられる。

さらに、レジオネラ属菌の病原性について dot 遺

伝子産物や *icm* 遺伝子産物など遺伝子レベルでの解析を進めていきたい。

謝辞：本研究に際し，貴重な臨床由来株を分与していただいた東邦大学医学部山口恵三博士ならびに東邦大学医学部附属大森病院村上日奈子先生に深謝いたします。

要 約

レジオネラ症に関する疫学的研究の一環として，2001年に全国の表層土壌から分離同定したレジオネラ属菌62株について *Acanthamoeba* 内での増殖能について検討したところ，供試菌株はすべて *Acanthamoeba* 内で増殖し，病原性を有するものと考えられた。また，増殖に要する最小菌数は $10^3 \sim 10^8$ CFU/ml で，菌株によって差異が認められた。

以上のように，土壌由来株はいずれも病原性であると考えられた。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，24: 27-36, 2003.
- 2) 古畑勝則，岡部弥穂，堂ヶ崎知格，原 元宣，福山正文：防菌防黴誌，30: 555-561, 2002.
- 3) 宮本比呂志，谷口初美，吉田真一：感染症誌，77: 343-345, 2003.
- 4) 石井圭一：アメーバ図鑑，p.100，金原出版，東京，1999.
- 5) Horwitz MA: J Exp Med, 166: 1310-1328, 1987.
- 6) 吉田真一：菌界展望，88: 722-729, 1996.
- 7) 厚生省生活衛生局企画課監修：新版レジオネラ症防止指針，p.12，(財)ビル管理教育センター，東京，1999.
- 8) Catrenich CE, Johnson W: Infect Immun, 57: 1862-1864, 1989.
- 9) Sadosky AB, Wiater LA and Shuman HA: Infect Immun, 61: 5361-5373, 1993.
- 10) 伊藤直美：感染症誌，57: 682-694, 1983.