Legionella pneumophila の *Acanthamoeba* 内増殖を調べる 定性検査法（アメーバ寒天法）の開発

¹⁾産業医科大学医学部微生物学, ²⁾九州大学大学院医学研究院細菌学分野

宮本比呂志¹⁾ 谷口 初美¹⁾ 吉田 真一²⁾

(平成 14 年 12 月 6 日受付)

(平成 15 年 1 月 28 日受理)

Key words : *Legionella pneumophila*, *Acanthamoeba culbertsoni*, virulence

〔感染症誌 77 : 343~345, 2003〕

序 文

Legionella pneumophila が病原性を発揮するうえで最も重要な性質は細胞内増殖能と考えられている¹⁾。近年, この細胞内増殖を支配する *L. pneumophila* の遺伝子群が明らかにされ *Icm/Dot* と名付けられた²⁾³⁾。これらの遺伝子群は本菌の *Acanthamoeba* (以下アメーバと略す) 内増殖にも必須な遺伝子であることも明らかにされた⁴⁾。この知見は菌株のアメーバ内増殖能を評価すれば, その菌株の病原性を評価することが可能であることを示唆している。菌株のアメーバ内増殖能を簡便に評価出来る定性法を考案すれば, 多数の環境分離株の病原性を簡単に調べることができるので有益と考えられる。

材料と方法

供試菌; 強毒株として臨床分離株である *L. pneumophila* Philadelphia-1 (血清群 [SG] 1, ATCC 33152), Nagasaki-80045 (SG1), Togus-1 (SG2, ATCC 33154), EY 3702 (SG3), GIFU 11491 (SG 4), GIFU 11395 (SG5) を用いた。これらの菌株は全てモルモット Mφ 内で増殖できる⁵⁾⁶⁾。一方,

弱毒株としてモルモット Mφ 内で増殖できない *L. pneumophila* 25D (SG1)⁷⁾, LELA 4086 (SG1)⁴⁾ を使用した。Gil and Shuman の方法¹⁾ に準じこれらの菌株のアメーバ内増殖を経時的に測定した。また, ヒメネツ染色による形態学的観察も経時的に行った。アメーバ寒天培地の作製; *Acanthamoeba culbertsoni* GS89-1001 (鶴原 喬博士より供与) を AC buffer⁴⁾ に懸濁し, 約 1×10^6 cells/ml の濃度に調整後, その 3ml を BCYE 培地に重層した。シャーレを適度に揺らしてアメーバ懸濁液が培地表面全体を覆うようにしたのち, 3 時間, 30℃ で培地を静置した。その後, 培地表面に付着しなかったアメーバと培地に吸収されなかった AC buffer を吸引除去した。アメーバが BCYE 培地の表面全体に付着した培地を「アメーバ寒天培地」と名付けた。培養; 供試菌株の単一集落を滅菌爪楊枝で穿刺し釣菌した後, まず BCYE 培地に接種し, 次にアメーバ寒天に接種した。その後, 30℃ で 6 日間静置培養した後, BCYE 培地とアメーバ寒天培地上での集落形成を比較・観察した。また, アメーバ寒天培地上でアメーバに捕食されなかった非被食菌が集落を形成できるかを調べるため, アメーバ内増殖能を欠く *L. pneumophila* 25D の濃厚菌液 (MacFarland No4) を作成し, その 5μl を BCYE 培地とアメーバ寒天培地にそれぞれスポットし

別刷請求先: (〒807-8555) 北九州市八幡西区医生ヶ丘
1-1

産業医科大学医学部微生物学

宮本比呂志

平成15年5月20日

Fig. 1 Colony formation of *L. pneumophila* on BCYE (upper) and amoeba (below) agar plates. A1 and a1; strain Philadelphia-1, A2 and a2; strain Nagasaki 80045, A3 and a3; strain Togus-1, A4 and a4; no bacteria inoculated, B1 and b1; strain EY 3702, B2 and b2; strain GIFU 11491, B3 and b3; strain GIFU 11395, B4 and b4; strain 25D, C1 and c1; strain LELA4086.

た。30℃で6日間培養した後、対象のBCYE培地とアメーバ寒天培地上での集落形成を比較した。

結 果

6株の強毒株はアメーバ内で増殖し、感染2日後には100～500倍に増殖した。ヒメネツ染色でも増殖像が観察された。これらの強毒株はBCYE寒天培地、アメーバ寒天培地の両者で集落形成が観察された(Fig. 1)。一方弱毒株2株はいずれもアメーバ内で増殖できなかった。これらの弱毒株ではBCYE寒天培地のみで集落が観察され、アメーバ寒天培地では集落を形成することができなかった(Fig. 1; B4とb4, C1とc1)。また、アメーバ寒天培地に弱毒株を多量に接種した場合、培養2日

後に非被食菌による微小な集落が形成された。しかし、培養6日後にはこの集落は完全に消失し、消失した微小集落の跡にはアメーバの増殖による培地表面の円状混濁が観察された。

考 察

*L. pneumophila*の病原性の解析にはヒトや動物由来の培養細胞などが利用されてきた¹⁾。*Acanthamoeba*はこれらの細胞に比べ乾燥に強く、また固相に付着する性質があることに着目し、本研究を行った。その結果、BCYE寒天培地のみで集落が観察され、アメーバ寒天培地で集落が観察されない場合は調べた菌株はアメーバ内での増殖能を失った菌株と判断できること、アメーバ内増殖能を欠く菌株は、たとえ非被食菌が多くてもアメーバ寒天上で集落を形成できないこと、それゆえBCYE寒天培地、アメーバ寒天培地の両者で集落が観察された場合は、その菌株はアメーバ内で増殖能を持つと判断できること、が明らかになった。以上の結果はアメーバ寒天法が分離株のアメーバ内増殖能を調べる定性法として有効であり、多数の*L. pneumophila*環境分離株の病原性を評価する際のスクリーニング方法として有益であることを示していると考えられる。

謝辞：本研究は平成14年度厚生労働科学研究費補助金(研究課題：生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究)の支援を受けて行われた。*Acanthamoeba culbertsoni* GS89-1001を分与頂きました鶴原 喬博士に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 吉田真一, 宮本比呂志, 小川みどり: レジオネラ属菌の比較生物学—宿主との相互関係を中心に—。日細誌 1995; 50: 745—64.
- 2) Segal G, Shuman HA: How is the intracellular fate of the *Legionella pneumophila* phagosome determined? Trends Microbiol 1998; 6: 253—5.
- 3) Vogel JP, Isberg RR: Cell biology of *Legionella pneumophila*. Curr Opin Microbiol 1999; 2: 30—4.
- 4) Segal G, Shuman HA: *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. Infect Immun 1999; 67: 2117—24.
- 5) Miyamoto H, Maruta K, Ogawa M, Beckers MC, Gros P, Yoshida S: Spectrum of *Legionella* spe-

- cies whose intracellular multiplication in murine macrophages is genetically controlled by *Lgn* 1. Infect Immun 1996 ; 64 : 1842—5.
- 6) Miyamoto H, Jitsurong S, Shiota R, Maruta K, Yoshida S, Yabuuchi E : Molecular determination of infection source of a sporadic *Legionella* pneumonia case associated with a hot spring bath. Microbiol Immunol 1997 ; 41 : 197—202.
- 7) Horwitz MA : Characterization of avirulent mutant *Legionella pneumophila* that survive but do not multiply within human monocytes. J Exp Med 1987 ; 166 : 1310—28.

A Simple Qualitative Assay for Intracellular Growth of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba culbertsoni*

Hiroshi MIYAMOTO¹⁾, Hatsumi TANIGUCHI¹⁾ & Shin-ichi YOSHIDA²⁾

¹⁾ Department of Microbiology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health

²⁾ Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University