

15. レジオネラ属菌を効率的に検出するための、培地成分に

関する検討

○越 勝男（岐阜県保健環境研究所）

【研究目的】

本研究では、レジオネラ属菌の培養法における菌検出の改善のため、既存のレジオネラ属菌培地を基にアミノ酸等を添加することによる培地の改良を目的とした。

【研究の必要性】

レジオネラ属菌(主に *Legionella pneumophilla*)は、土壌などの自然環境に普通に存在している細菌で、人工環境中の循環式浴槽や空調設備の冷却塔内で増殖、これらから発生した飛沫の吸入により、レジオネラ属菌の感染が起こる。レジオネラ症は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(以下「感染症法」という。)」に基づく4類感染症であり、2004年までの全国の報告数は年間150件前後であったのが、尿中抗原検査法等の普及により年々増加し、2018年には2130件が報告されている。

レジオネラ症の主な感染源となる浴槽水等に対して、実施されるレジオネラ属菌検査として、培養法と遺伝子検査等の迅速検査法が使用されている。迅速検査法は行政指導や、営業施設のレジオネラ属菌対策効果の指標として、近年、保健所による営業施設等への監視指導や事業者の自主衛生管理に活用されている。一方、患者株との比較による感染源の同定及び行政処分には、生菌の分離が必要なことから、感染症学並びに行政の執行上、依然として培養法が重要である。

レジオネラ属菌培養用の培地として、通知(令和元年9月19日 薬生衛発0919第1号)、国立感染症研究所病原体検出マニュアルに、非選択培地としてBCYE α 寒天培地、選択培地としてGVPC α 、MWY寒天培地等が主に記載され、実際の検査に利用されている。

本研究では、レジオネラ属菌が通常の菌と異なり糖利用を行わないこと、栄養素として各種のアミノ酸等が重要であることが示唆(1-4)されていることから、既存のレジオネラ属菌培地にアミノ酸等を添加することにより培地の改良を試みた。

【研究方法】

(1) ケトグルタル酸、アミノ酸を添加したBCYE α 培地でのレジオネラ属菌の発育検討

BCYE α 寒天培地は、レジオネラCYE寒天基礎培地(OXIOD)を滅菌蒸留水に加温懸濁し、高圧蒸気滅菌後、50°Cまで放冷し、レジオネラBCYE α 発育サプリメント(OXIOD)を添加調整した。0.05% activated charcoal BCYE α 寒天培地は、通常の4分の1量のレジオネラCYE寒天基礎培地にBacto Yeast Extract(BD)及びBacto Agar(BD)を用いYeast ExtractとAgarの終濃度を通常のBCYE α 寒天培地の同等である10 mg/ml及び15 mg/mlに調製後、滅菌蒸留水に加温懸濁し、高圧蒸気滅菌後、50°Cまで放冷し、レジオネラBCYE α 発育サプリメント(OXIOD)を添加作成した。これに必要な応じKOHでpH6.9に調製した α -ketoglutaric acid(NACALAI TESQUE)、L-Glutamine(Thermo Fisher Scientific)、MEM Non-Essential Amino Acids Solution(100X)(Thermo Fisher Scientific)及びMEM Amino Acids Solution(50X)(Thermo Fisher Scientific)を終濃度0.2%、200 mg/l、2X及び2Xとなるよう添加した。発育検討には *L. pneumophila* SG1(ATCC 33152)、*L. bozemanii*(ATCC 33217)及び *L. gormanii*(ATCC 33297)を用いた。菌株はBCYE α に塗布し30°C、3日培養したものを、滅菌水にMcFarland 1(1E+8 CFU/ml)になるように調製、これを1E+3 CFU/mlに希釈した。

希釈液の 100 μl を各試験培地に播種し 37°C で培養を行った。観察は培養 2 日目、3 日目、7 日目に行い、写真を Printgraph CMOS1 (ATTO) を用い撮影、コロニー数、コロニー径の計測は Image J ソフトウェア (NIH) を用い行った。

(2) Nitisinone のレジオネラ属菌発育に対する影響の検討

レジオネラ属菌の菌株は BCYE α に塗布 30°C、3 日培養したものを、滅菌水に McFarland 1 (1E+8 CFU/ml) になるように調製、0~10 mg/ml Nitisinone (富士フィルム和光純薬) 含有 BYE α 液体培地に終濃度 1E+4 CFU/ml になるように懸濁し、37°C で培養を行った。吸光度の測定は培養 24 時間、36 時間、48 時間、60 時間、72 時間、96 時間及び 120 時間に行った。

(3) グラム陰性菌を対象とした選択剤の検討

薬剤耐性の検討には微量液体希釈法を用いた。使用した菌株は表 1 のとおり。レジオネラ属菌の検討は既報 (5) に則り実施した。つまりレジオネラ属菌の菌株は BCYE α に塗布 30°C、3 日培養したものを、滅菌水に McFarland 1 (1E+8 CFU/ml) になるように調製、この 50 μl 菌液を 5 ml の BYE α 液体培地に懸濁し、試験液とした。レジオネラ属菌以外の菌株については、MUELLER-HINTON 寒天培地 (OXIOD) で 37°C、1 日培養したものを McFarland 1 (1E+8 CFU/ml) になるように調製、25 μl 菌液を 12 ml ミューラーヒントンブイオン栄研 (栄研化学) に懸濁し試験液とした。各試験液はドライプレート・栄研'96 又は 192 プレート (栄研化学) に添加し、レジオネラ属菌は 37°C、2 日、レジオネラ属菌以外は 37°C、1 日培養後、判定を行った。

【結果】

(1) ケトグルタル酸、アミノ酸を添加した BCYE α 培地でのレジオネラ属菌の発育検討

アミノ酸等を添加した BCYE α 培地でのレジオネラ属菌の発育を検討するために、BCYE α 寒天培地、BCYE α 寒天に α -ketoglutaric acid、L-Glutamine 等のアミノ酸を添加した培地、前記の培地より L-Glutamine を除いた培地 (以下 BCYE α アミノ酸寒天培地とする) 及び BCYE α アミノ酸寒天培地から活性炭の濃度を 0.2% から 0.05% へ変更した培地 (以下 0.05% activated charcoal BCYE α アミノ酸寒天培地とする) の 4 群を用意し、*L. pneumophila* SG1 を用い、発育コロニー数及びコロニー径の比較を行った。その結果 (図 1)、培養 2 日目及び 7 日目の生育コロニー数について有意な変化 ($p < 0.01$) は認められなかったが、コロニー径は BCYE α 寒天培地に比較し、他の 3 群で有意に大きくなることが観察された。続いて *L. bozemanii* 及び *L. gormanii* について、BCYE α 寒天培地、BCYE α アミノ酸寒天培地及び 0.05% activated charcoal BCYE α アミノ酸寒天培地を用い発育コロニー数及びコロニー径の比較を行った。その結果、*L. bozemanii* は、培養 2 日目から 0.05% activated charcoal BCYE α アミノ酸寒天培地における発育コロニー数が他の培地より有意に多くなり、*L. gormanii* では、BCYE α アミノ酸寒天培地及び 0.05% activated charcoal BCYE α アミノ酸寒天培地での発育コロニー数が BCYE α 寒天培地より有意に多くなることを観察された。コロニー径に関しては、*L. bozemanii* の培養 2 日目、0.05% activated charcoal BCYE α アミノ酸寒天培地で他の培地と比べコロニー径が大きくなることを観察されたが、7 日目では有意な差はなかった。*L. gormanii* についてはコロニー径の変化は観察されなかった。

(2) Nitisinone のレジオネラ属菌発育に対する影響の検討

レジオネラ属菌の発育へ影響を及ぼす薬剤等の探索のために、レジオネラ属菌自体が産生する Homogentisic acid (HGA) が自身に拮抗的に作用するという報告 (6) より HGA 産生の阻害を目的として 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害薬である Nitisinone を BYE α 培地に添加し *L.pneumophila* SG1 の培養を行った。菌生育は 600 nm の吸光度を指標に、HGA の産生については、HGA が melanin と pigmentation を生じさせるため、400 nm の吸光度を指標に測定を行った。その結果、Nitisinone 添加群では培養 72 時間から 400 nm の吸光度が有意に低下し HGA の産生抑制が示唆された。また一方、菌の生育

については Nitisinone 添加群 5, 10 mg/ml の培養 48 時間、60 時間で低下が認められた(図 2)。

(3) グラム陰性菌を対象とした選択剤の検討

アミノ酸等添加培地へのグラム陰性菌を対象とした抗生剤添加の候補検討のため、レジオネラ属菌及び環境菌の ATCC 株を用いた微量液体希釈法により、薬剤耐性を確認した。5 つの ATCC 株のレジオネラ属菌 (*L. pneumophila*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. longbeachae*)を用いた微量液体希釈法の結果、共通して CL(コリスチン)に耐性若しくは比較的高い MIC 値を示した(表 1)。CLは *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* 及び *Sphingobacterium multivorum* にも耐性が認められた。また AZT(アズトレオナム)に対し *L. bozemanii* を除くレジオネラ属菌は耐性若しくは高い MIC 値を示したが、*S. marcescens*, *P. mirabilis* は感性であった。

【考察と今後の課題】

アミノ酸等を添加した BCYE α 培地でのレジオネラ属菌の発育検討では、0.05% activated charcoal BCYE α アミノ酸寒天培地において、*L. pneumophila*, *L. bozemanii* 及び *L. gormanii* で現行の培地と比較して高いコロニー径又はコロニー数が検出された。このことから、通常の BCYE α 寒天培地と比較し、改変培地ではレジオネラ属菌が良好に発育する可能性が示された。レジオネラ属菌においても菌種により、改変培地への反応が異なったため、今後は *L. pneumophila*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae* など他のレジオネラ属菌の標準株による確認と添加成分の最適化が必要であると考え。また Nitisinone の添加では *L. pneumophila* による pigmentation の抑制を確認したが、菌発育の促進は確認できなかった。これは既報の低 L-Cystein 下において HGA が菌発育抑制の効果を発揮するということと矛盾しない。続いてアミノ酸等添加培地へのグラム陰性菌を対象とした抗生剤添加のため、ATCC 株を用いた微量液体希釈法を実施した結果、5 つの ATCC 株のレジオネラ属菌 (*L. pneumophila*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. longbeachae*)は CLに、*L. bozemanii* を除く 4 株は AZT に対し耐性若しくは高い MIC 値をそれぞれ示した。今後、培地添加グラム陰性菌用抗菌剤の選択のため、さらに環境・臨床分離レジオネラ属菌及び雑菌の薬剤耐性状況の把握を進めていくことが必要だと考える。本研究では、レジオネラ属菌の培養法における菌検出の改善のため、既存のレジオネラ属菌培地を基に菌の代謝に必要な成分(主に各種アミノ酸)を添加することによる培地の改良を目的とした。今後培地の改善のため、標準株以外の環境分離株や実際の浴槽水等での検討が必要になると考える。

【参考文献】

1. L Pine, JR George, MW Reeves, WK Harrell. Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol.* 1979. 9(5):615-26.
2. WJ Warren, RD Miller. Growth of Legionnaires disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in chemically defined medium. *J Clin Microbiol.* 1979. 10(1):50-5.
3. JR George, L Pine, MW Reeves, WK Harrell. Amino acid requirements of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol.* 1980.11(3):286-91.
4. MJ Tesh, RD Miller. Amino acid requirements for *Legionella pneumophila* growth. *J Clin Microbiol.* 1981.13(5):865-9.
5. D Jonas, I Engels, FD Daschner, U Frank. The effect of azithromycin on intracellular *Legionella pneumophila* in the Mono Mac 6 cell line at serum concentrations attainable *in vivo*. *J Antimicrob Chemother.* 2000. 46(3):385-90.
6. TC Levin, BP Goldspiel, HS Malik. Density-dependent resistance protects *Legionella pneumophila* from its own antimicrobial metabolite, HGA. *eLife* 2019;8:e46086.

【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費	
試薬(MEM Amino Acids Solution、MEM Non-Essential Amino Acids Solution、Nitisinone)	40,194 円
抗生物質(Aztreonam)	10,296 円
培地用サプリメント(Legionella BCYE Supplement without L-cys)	18,612 円
薬剤感受試験用消耗品(ドライプレート 192 プレート、ドライプレート 関連消耗品)	92,510 円
標準菌株(KWIK-STIK <i>Legionella longbeachae</i> 他全 9 菌株)	103,977 円
その他消耗品(デスク型光学側微ルーペ)	34,411 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円

A (*Legionella pneumophila* ATCC Day2, Day7) B (*Legionella bozemanii* ATCC Day2, Day7) C (*Legionella gormanii* ATCC Day2, Day7)

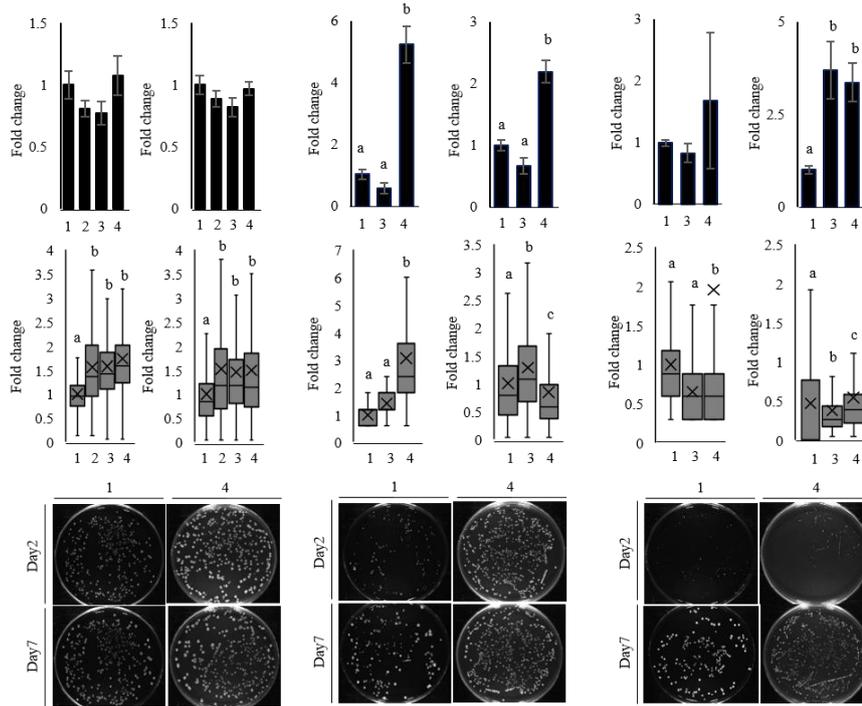


図1 ケトグルタル酸、アミノ酸を添加したBCYE α 培地でのレジオネラ属菌の発育検討
 1: BCYE α 寒天培地, 2: BCYE α アミノ酸寒天培地 + L-Glutamine, 3: BCYE α アミノ酸寒天培地, 4: 0.05% activated charcoal BCYE α 寒天培地.
 アルファベットの違う値はTukey-Kramer法で有意 ($p < 0.01$) に差が認められたもの。

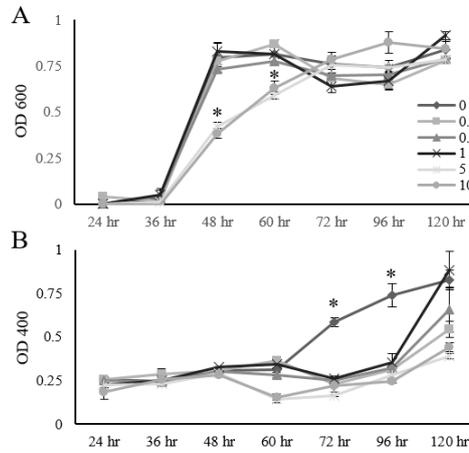


図2 Nitisinoneのレジオネラ属菌発育に対する影響の検討
*L. pneumophila*をNitisinone 0-10 mg/ml含有BYE α 培地で培養した。
 * Tukey-Kramer法で有意 ($p < 0.01$) に他群と差が認められたもの。

表 1. レジオネラ属菌等の薬剤感受性試験 (ATCC株)

	PIPC	CTX	CAZ	CFPM	AZT	CPFX	IPM	MEPM	GM	AMK	MINO	CL	LVFX
<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (ATCC 33152)	8	2	≤ 0.5	≤ 0.5	> 32	0.06	≤ 0.25	≤ 0.25	4	≤ 2	4	> 16	≤ 2
<i>Legionella bozemanii</i> (ATCC 33217)	1	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.03	0.5	≤ 0.25	2	≤ 2	16	> 16	≤ 2
<i>Legionella dumoffii</i> (ATCC 33279)	32	8	1	≤ 0.5	> 32	≤ 0.03	1	≤ 0.25	1	≤ 2	2	> 16	≤ 2
<i>Legionella gormanii</i> (ATCC 33297)	2	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	8	≤ 0.03	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.5	≤ 2	2	8	≤ 2
<i>Legionella longbeachae</i> (ATCC33462)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5	> 32	≤ 0.06	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 1	≤ 4	≤ 1	> 8	≤ 0.12
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC BAA-1706)	32	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5	4	2	2	1	≤ 1	≤ 4	8	1	2
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1</i> (ATCC 4352)	64	2	2	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.06	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 1	≤ 4	≤ 1	≤ 0.5	≤ 0.12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	4	32	2	2	> 32	> 4	2	0.5	4	16	> 16	≤ 0.5	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	8	16	≤ 1	1	4	> 4	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 1	≤ 4	> 16	≤ 0.5	4
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5	1	2	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 1	≤ 4	≤ 1	≤ 0.5	4
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	8	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5	≤ 0.5	0.5	≤ 0.5	≤ 0.12	≤ 1	≤ 4	≤ 1	≤ 0.5	≤ 0.12
<i>Serratia marcescens</i> (ATCC 13800)	4	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5	4	> 4	1	≤ 0.12	≤ 1	≤ 4	2	> 8	2
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 0.5	1	≤ 0.06	2	≤ 0.12	≤ 1	≤ 4	> 16	> 8	4
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (ATCC 13637)	> 128	> 64	2	> 32	> 32	0.25	> 32	> 32	≤ 1	≤ 4	≤ 1	2	0.5
<i>Sphingobacterium multivorum</i> (ATCC 35656)	64	16	8	4	> 32	0.25	16	8	8	> 64	≤ 1	> 8	≤ 0.12