神奈川県衛生研究所研究報告　No.36　(2006)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

短報

アメーバ内増菌法を利用したレジオネラ属菌の検出

渡辺祐子，高橋智恵子，大屋日登美，岡崎則男

Isolation of *Legionella* spp. Using an Amoebaic Coculture Procedure

Yuko WATANABE, Chieko TAKAHASHI
Hitomi OHYA and Norio OKAZAKI

はじめに

温泉や冷却塔水などの環境水からのレジオネラ属菌検出法は，通常，レジオネラ症防止指針[1)]や上水試験方法[2)]等に基づき直接培養法で行われている．しかし，レジオネラ属菌の発育が遅いことから，初代分離培養には3日から7日を要し，このためレジオネラ属菌以外の菌やカビなどの夾雑微生物の混入が多い検体ではこれらの発育により，レジオネラ属菌の検出を困難にしてしまうことがある．また,レジオネラ属菌数が少ない検体においては増菌法の利用が考えられるが，増菌法は簡便な選択増菌培養培地がないことや結果が判明するまでに日数を要することから,一般的には増菌法は採用されていない．一方，レジオネラ属菌は細胞内増殖性を持つことから，レジオネラ属菌宿主アメーバ内で増殖し，放散されることが知られている[3,4)]．そこで，夾雑微生物の混入が多い検体からレジオネラ属菌の検出を可能にし，検出感度を高めるため，レジオネラ属菌の宿主アメーバ（以下アメーバ）を利用した増菌法について検討を行った．なお，レジオネラ属菌のアメーバを利用した増菌培養法は，検出方法として確立されていないが，土壌からのレジオネラ属菌の検出にアメーバを利用した方法が報告されている[5)]．

方　法

1. レジオネラ属菌のアメーバ内増殖性について

アメーバ培養液(PYGC培地)10mlを入れたボトル中でアメーバ(*Acanthamoeba* spp. TACE-1)を30℃で2日間培養した．さらに，温泉分離株 *Legionella pneumophila* 1群を10^6CFU/mlの濃度になるように接種して，30℃で培養した．この培養液を原則8時間ごとに，スライドガラス5枚にスポイトで1滴ずつ採取し，ギムザ染色を行い，アメーバ内の*L. pneumophila*を観察した．

2. アメーバ存在下の*L. pneumophila*菌数の経時的推移について

20ml滅菌蒸留水および50％PYGC培地をそれぞれ入れた2種類のボトル各2本に，3日培養した*L. pneumophila*を10CFU/mlと100CFU/mlになるように接種した．これらに2日培養した新鮮培養アメーバを10^6個/mlに添加し，30℃で培養して，24時間ごとに培養液100μlを取り必要に応じて希釈を行い，BCYE培地に塗布して培養液中の*L. pneumophila*菌数を測定した．

3. アメーバ内増菌法と直接培養法の比較

直接培養法はレジオネラ症防止指針に従い河川水1,000mlを検体とし，0.45μmのメンブランフィルターでろ過濃縮後，4分間酸処理（0.2M HCl･KCl buffer pH2.2）を行った．その0.1mlをWYOα寒天培地に塗布し，36℃で培養後レジオネラ属菌の検出を行った．また，アメーバ内増菌法は河川水100mlをコルベンに入れ，それにPYGC培地で2日培養しておいたアメーバを10^6個/mlに添加し,30℃で60日間培養した.その50mlを取り，3800rpm20分間遠心後,0.5mlを残し上清を取り除いた(100倍濃縮)．その0.2mlを50℃5分間加熱処理後，さらに室温で5分間等量の酸処理液（0.2M HCl･KCl buffer pH2.2）で処理を行い，0.1mlをWYOα寒天培地に塗布し，これらを直接培養法と同様に培養した．温泉水についても河川水と同様にアメーバ内増菌法の利用を検討した．この時のアメーバ内増菌法の培養期間は30日とした．

結　果

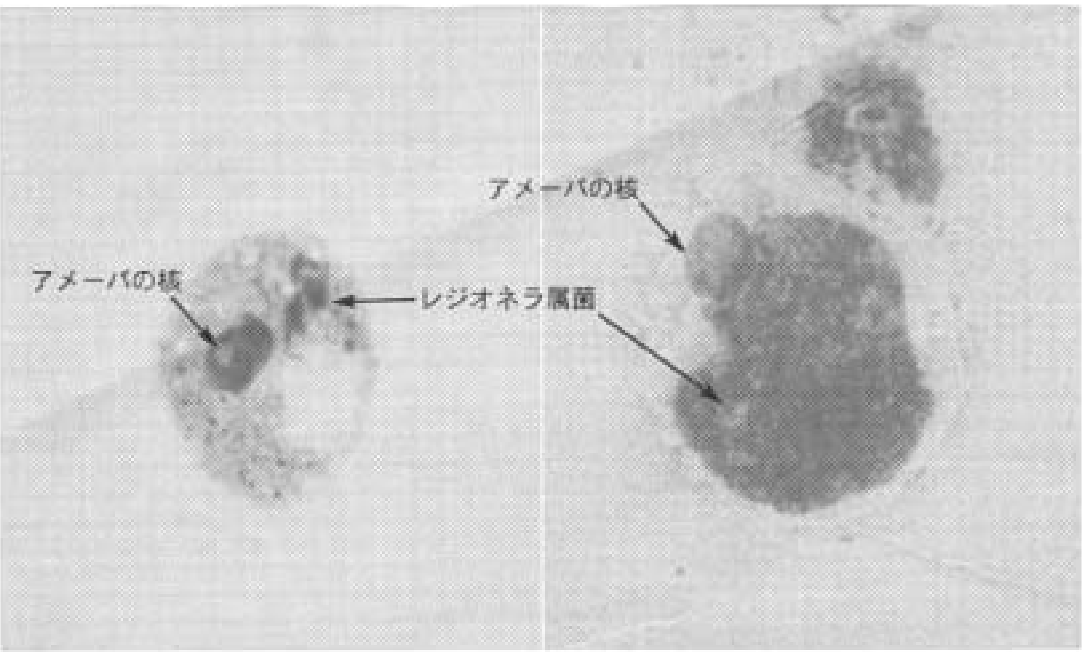
1. レジオネラ属菌のアメーバ内増殖性

培養24時間前後からアメーバ内に*L. pneumophila*の増殖が認められ（図1），さらに約48時間後には，増殖した*L. pneumophila*がアメーバ外へ放散される様子が観察された．このように*L. pneumophila*がアメーバ内に取り込まれた後2日～3日で菌数が増加し，アメーバを破壊して放散することが判明した．

2. アメーバ存在下の*L. pneumophila*菌数の経時的推移について

図2に示すように，*L. pneumophila*培養開始後約48時間までは培養液中の*L. pneumophila*菌数の変化は認められなかったが，これ以降，アメーバ添加ボトルでは，*L. pneumophila*の菌数が急増した．これはアメーバ内で増殖した*L. pneumophila*が外部へと放散された結果，培

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1



A.培養開始後約24時間　　B.培養開始後約48時間

図1 レジオネラ属菌（*L. pneumophila* 1群）のアメーバ内での増殖

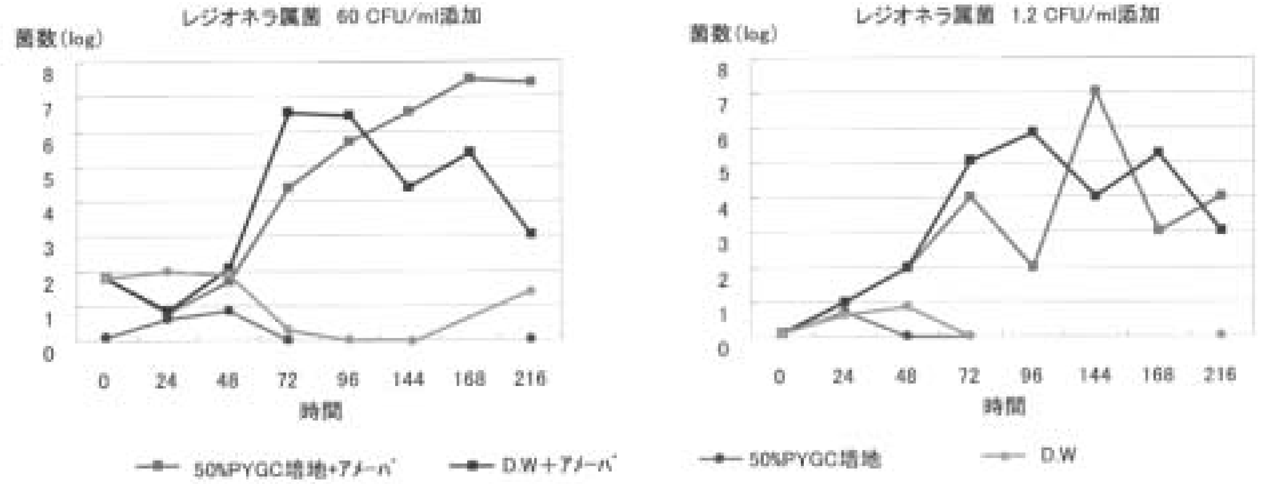


図2 アメーバ内増菌法における*L.pneumophila* 1群の経時的菌数の推移

養液中の菌数の増加がもたらされたものと考えられた。

3.アメーバ内増菌法と直接培養法の比較

10件の河川水のレジオネラ属菌検出結果を表1に示した。直接培養法では加熱処理と酸処理を併用したにもかかわらず，夾雑微生物の発育が著しくこの結果，発育が遅いレジオネラ属菌は，発育が妨げられているのか，存在しないのかの判定がつかないために判定不可となったものが8件あり，検出されたのは2件のみであった。一方，アメーバ内増菌法では，判定不可となった8件のうち6件からレジオネラ属菌を検出することができた。

温泉水についての結果を表2に示した。温泉水の場合は直接培養検査における夾雑微生物の発育は少なく，直接培養法により10件中5件から検出された。直接培養法の検出限界である＜10 CFU/100mlの検体5件のうちアメーバ内増菌法では2件からレジオネラ属菌を検出した。しかし直接培養検査でレジオネラ属菌を検出した5件のうちアメーバ内増菌法において1件は純粋培養状にレジオネラ属菌が検出されたが，2件は夾雑微生物が発育し，レジオネラ属菌発育の確認ができなかった。他の2件は，培地上にレジオネラ属菌を含む集落の発育が認められなかった。

表１ 河川水におけるアメーバ内増菌法を利用したレジオネラ属菌の検出

検体名	*Legionella* 属菌検出状況 直接培養	アメーバ増菌培養
河川水１	判定不可＊	検出
河川水２	判定不可	検出
河川水３	判定不可	不検出
河川水４	判定不可	検出
河川水５	判定不可	検出
河川水６	判定不可	検出
河川水７	200 CFU/100ml	検出
河川水８	判定不可	検出
河川水９	判定不可	不検出
河川水 10	10 CFU/100ml	検出

＊　判定不可：夾雑微生物発育のため

表２ 温泉水におけるアメーバ内増菌法を利用したレジオネラ属菌の検出

検体名	*Legionella* 属菌検出状況 直接培養	アメーバ増菌培養
温泉１	<10 CFU/100ml＊	不検出
温泉２	<10 CFU/100ml	検出
温泉３	<10 CFU/100ml	検出
温泉４	130 CFU/100ml	判定不可＊＊
温泉５	40 CFU/100ml	判定不可
温泉６	20 CFU/100ml	検出（純粋培養状）
温泉７	50 CFU/100ml	不検出
温泉８	<10 CFU/100ml	不検出
温泉９	190 CFU/100ml	不検出
温泉 10	<10 CFU/100ml	不検出

＊　<10CFU/100ml：検出限界

＊＊　判定不可：夾雑微生物発育のため

考　察

レジオネラ属菌の発育を妨げる夾雑微生物が多数存在する河川水のレジオネラ属菌検出にアメーバ内増菌法が有用と考えられた．また，夾雑微生物の少ない温泉水においても，直接培養法では検出できなかった温泉水からレジオネラ属菌を検出することができた．

一方，温泉水から直接培養法でレジオネラ属菌が検出された検体にもかかわらず，アメーバ内増菌法で検出されない例が認められた．これは，温泉水においては，40～50℃前後の生息環境や泉質のpHが影響して加熱や酸処理に抵抗性のある菌が生息し，WYOα寒天培地上に優勢に発育してレジオネラ属菌の発育を妨げたことにより，検出できなかった可能性が予想された．しかし，培地上に集落の発育の認められなかった２件については原因は不明であり，今後の検討を要する課題であると考えられた．

アメーバ増菌培養期間は土壌からレジオネラ属菌を分離する方法[5]に要する培養時間から，経験的に今回30日と60日間としたが，レジオネラ属菌のアメーバ内増殖時間を考慮すれば，現在よりも短縮することが可能と考えられる．さらにPCR法と併用するなど検査時間の短縮も課題と考えられる．アメーバ内増菌法は，夾雑微生物が多く混在する検水の検査法として有用と考えられるとともに，通常の直接培養法でレジオネラ属菌が検出限界以下（＜10CFU/100ml）の検体であっても，検出できる可能性が示唆された．これにより検水中に検出限界以下であってもレジオネラ属菌が生息していることが判明することにより事前に維持管理を強化するなど，予防対策をとりうると考えられる．今後，これらレジオネラ属菌の検出を妨げる要因について検討を行い，より効果的な検査方法の確立を進めていきたい．

謝　辞

Acanthamoeba spp. TACE-1を分与していただくとともに，貴重なご助言をいただきました国立感染症研究所寄生動物部の八木田健司先生に深謝いたします．また，検体採取にご協力いただいた当所黒木俊郎主任研究員に深謝いたします．

（平成18年7月20日受理）

文　献

１）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，財団法人ビル管理教育センター編，東京(1997)

２）水質試験等調査専門委員会：上水試験方法2001年版，社団法人日本水道協会編,東京(2001)

３）八木田健司，泉山信司，遠藤卓郎：レジオネラ属菌の水系汚染ー宿主アメーバの果たす役割，水環境学会誌**26**, 14-19 (2003)

４）古畑勝則：レジオネラ汚染対策におけるアメーバの重要性，防菌防黴，**30**, 217-223(2002)

５）古畑勝則：土壌からのレジオネラ属菌の分離状況，防菌防黴，**30**, 555-561(2002)