

繊毛虫を用いた一般循環水中の *Legionella* 等の雑菌除去処理法の開発

研究代表者 理工学研究科 杉井 学 (D2)

研究の目的

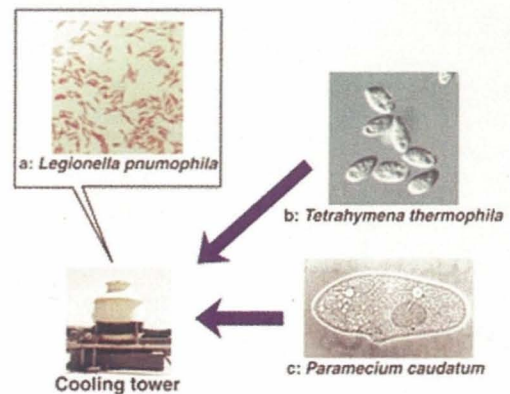
グラム陰性短桿菌である *Legionella* 属細菌は、1976年米国フィラデルフィアで、在郷軍人集会参加者の29名が死亡、221名が重症肺炎を起こした事件の原因菌として、初めて発見された。その後も、*Legionella* による肺炎発生の報告は世界各地に及んでおり、わが国も例外ではない。これまで単に肺炎と診断されてきたケースも、原因菌が *Legionella* である可能性は高く、米国では“シックビル症候群（シック・ビルディング・シンドローム）”と呼ばれ社会問題に発展している。

Legionella は、自然界ではごくありふれた土壌細菌であるが、ビル屋上などに設置される空調用冷却塔（クーリングタワー）や公園の噴水、銭湯などの循環水に混入して増殖することがわかっている。人体へは、これらの循環水のエアロゾル化した飛沫の吸引で感染するが、特に老人や幼児、免疫力の低下した人体に感染した場合に、重篤な肺炎を引き起こす。*Legionella* は、熱処理や塩素系化学薬品処理などで死滅するにもかかわらず、この菌が原因の肺炎が多発しているのは、コストや手間の面から適切に洗浄処理が行われている施設が少ないことが原因である。大阪府立公衆衛生研修所が行った空調用冷却水水質検査の結果、わが国の97.7%の施設で *Legionella* が検出されるに至った。都市化の中で人工的に作り出された、水環境に適応してしまった *Legionella* は、薬品処理だけでは適切に除去することが困難であるといえる。

そこで、*Legionella* 等の細菌処理において、化学薬品を使用せず、維持費を抑え、環境汚染問題を考慮した天敵生物を用いた処理法の開発を計画した。本プロジェクトでは、*Legionella* の天敵となり得る生物として繊毛虫に注目した。真核の単細胞生物である繊毛虫類の多くは、*Legionella* と同様のグラム陰性短桿菌で肺炎の原因菌でもある *Klebsiella pneumoniae* を餌として増殖できる。前培養した繊毛虫をクーリングタワー等の循環水中に少量添加することで、*Legionella* および他雑菌を効

率よく処理できる可能性が高い。また、現在 *Legionella* 対策として行われている化学薬品処理の問題点である、コスト高、手間、地球環境破壊などの多くの点も解決できると考えられる。そこで、効果的に *Legionella* 等を捕食できる繊毛虫を探し、循環水中で適切に増殖可能な株のスクリーニングを行う。また、装置内での捕食細胞の増殖を促進するために、細胞分裂制御タンパク質とその遺伝子調節の基礎研究を行う。得られたデータから、捕食者を用いた高効率で安全な *Legionella* 等の有害細菌の処理法を確立する。

研究成果



まず、繊毛虫に *Tetrahymena thermophila* (CU427) を選び、食胞内に *Legionella pneumophila* (serogroup 1 SMUM 2051) を取り込むことができるかを調べた。繊毛虫の培養に広く用いられる緩衝液 Dryl's solution (2mM Sodium citrate, 0.6mM Na₂HPO₄, 1.4mM NaH₂PO₄, 1.5mM CaCl₂, pH6.8) で、*T. thermophila* と *L. pneumophila* を30分間25℃でインキュベートし、その後、細胞を風乾・固定してからDNA染色剤(DAPI)で染色して観察した。*T. Thermophila* 食胞内に *L. pneumophila* のDNAを示すDAPIの強い蛍光(Fig.2, 矢じり部分)が観察され、*L. pneumophila* を食胞内に取り込めることがわかった。

そこで、*T. thermophila* が食胞内に取りこんだ *L. pneumophila* を消化して処理できているかどうかを調べるために、*T. thermophila* と *L. pneumophila* を 37°C で混合培養し、時間を追ってそれぞれの細胞数の変化を調べた (Fig.3,4)。培養液には、*Legionella* 用培地である TSB medium (3% [w/v] Tryptic soy broth [Difco No.3]) が Dryl's solution を 5ml 用いた。*L. pneumophila* の細胞数は、単独培養と比較して、わずかに低く抑えられた (Fig.3)。*T. thermophila* の増殖曲線には、単独培養と混合培養で顕著な違いは見られなかった。また、より実際の使用条件に近い、栄養素の含まれない緩衝液 Dryl's solution を用いて同様の実験を行った結果、混合培養によって、*T. thermophila* の増加とともに、*L. pneumophila* の細胞数は減少し、混合培養後 2 日後には、培養開始時の 1/2 に減少した (Fig. 4)。しかし、混合培養するそれぞれの細胞密度を変化させても、*L. pneumophila* の増殖曲線に顕著な変化が見られないこと、コントロールとして *L. pneumophila* の代わりに *K. pneumoniae* (6081) を用いた場合に比べると、混合培養時の *L. pneumophila* の減少率が低いこと、*L. pneumophila* と混合培養した *T. thermophila* を *L. pneumophila* free の培地に植え継いでも、増殖しない場合があることなどから、*T. thermophila* の *L. pneumophila* 消化速度は、*K. pneumoniae* よりも遅いか、あるいは、完全に消化できていないか、半共生的な寄生をしている可能性が示唆された。

Legionella が人体に感染し、肺炎を引き起こす原因は、*Legionella* がマクロファージに寄生し、消化されることなくマクロファージ内で増殖してしまうことにある。そのメカニズムの全容は明らかではないが、マクロファージの食胞内に取りこまれた *Legionella* は、食胞内の酸性化とその後のライソソームの融合を阻害するということがわかっている。そこで、pH の低下に伴って緑色から赤色へ変化するアクリジンオレンジを使い、*L. pneumophila* あるいは *K. pneumoniae* と繊毛虫を混合培養後、食胞内の pH 変化を観察した。混合培養する繊毛虫には、*Tetrahymena thermophila*, *Paramecium caudatum*, *Didinium nastum*, *Blepharisma japonicum* を使い、2 μ M アクリジンオレンジを含む Dryl's solution で 20 分間混合培養し、食胞内の色変化を経時的に観察した。また、

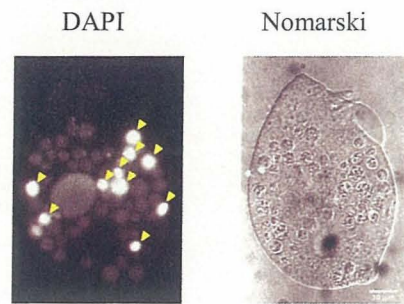


Fig.2 *L. pneumophila* を取りこんだ *T. thermophila* の DAPI 染色像

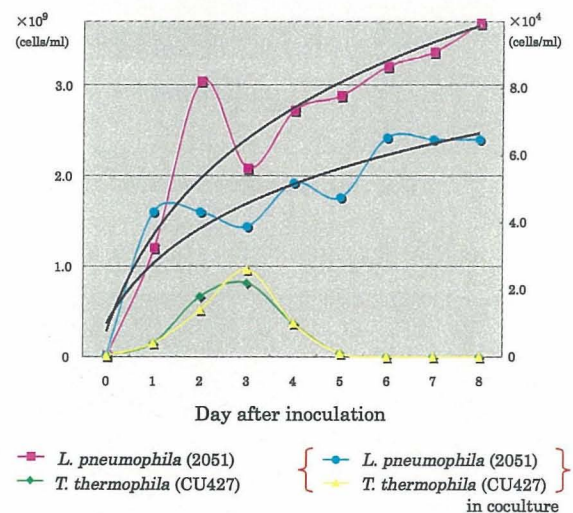


Fig.3 TSB medium を用いた混合培養時の細胞数の推移

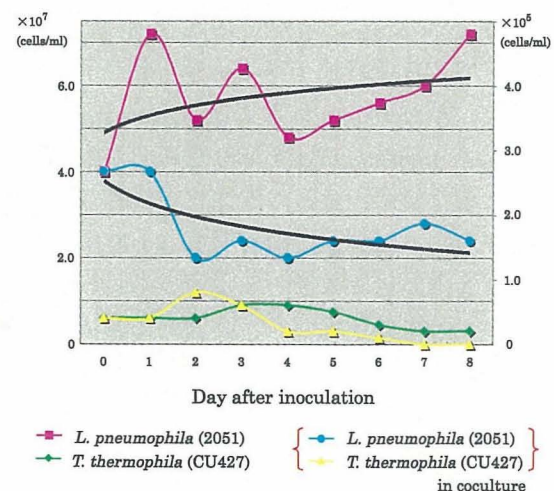


Fig.4 Dryl's solution を用いた混合培養時の細胞数の推移

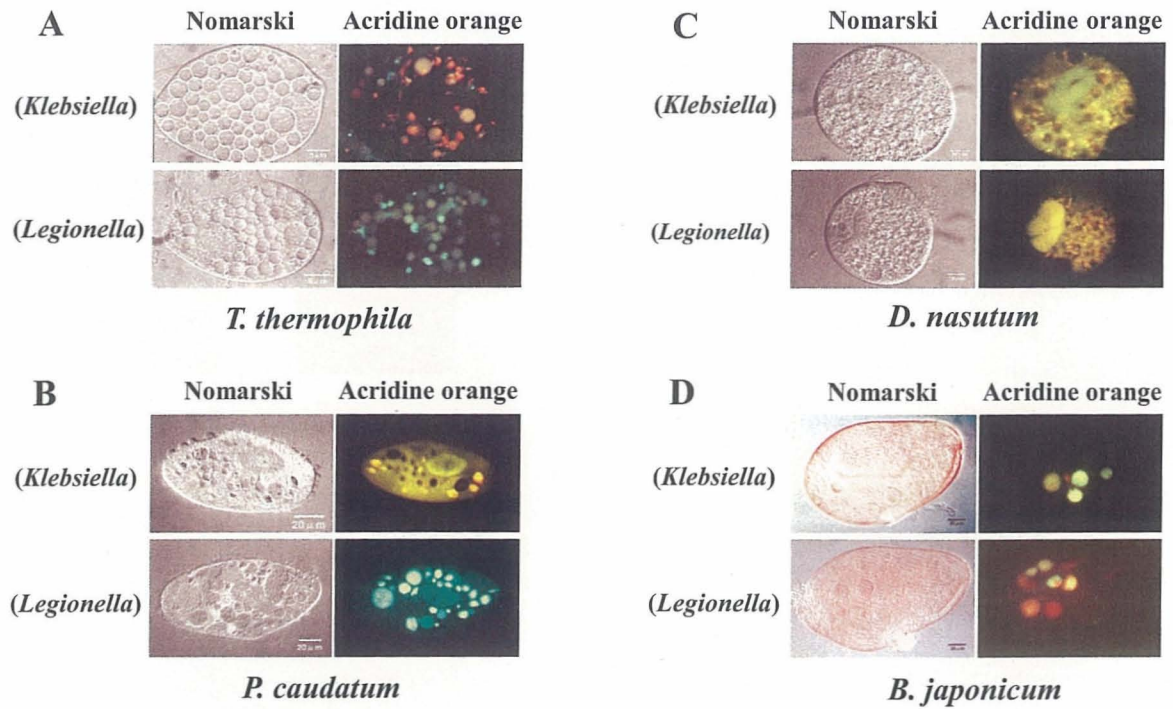


Fig.5 *L. pneumophila* または *K. pneumoniae* を取りこんだ食胞内の pH 変化

その後 48 時間混合培養を続けた繊毛虫を、風乾・固定後、DAPI で染色して繊毛虫細胞内の *L. pneumophila* の分布を調べた。

K. pneumoniae と混合培養した場合、もちいたすべての繊毛虫は、混合後すぐに *K. pneumoniae* を食胞内に取りこみ、*B. japonicum* 以外は、10 分以内に、*B. japonicum* は 30 以内に食胞は緑色から黄色あるいは赤色に変化した。pH は、6.8 から 2 付近まで低下していると考えられる。40 分後には赤色に染まった *K. pneumoniae* が食胞内に観察され、酸性化が正常に起こっていることが確認された (Fig.5, ABCD, 上段)。 *L. pneumophila* と混合培養した場合、*T. thermophila* および *P. caudatum* は、食胞内に *L. pneumophila* を取り込んでも食胞は緑色のまま変化せず、食胞の酸性化が阻害されていることがわかった (Fig.5, AB, 下段)。24 時間後においても食胞内の色は緑色から変化しておらず、48 時間後の DAPI 染色像でも、食胞内に密に詰まった *L. pneumophila* が観察され、食胞が壊れて細胞質に脱出している細胞も観察された (Fig.6, AB, 下段)。一方、*D. nasutum* と *B. japonicum* は、*L. pneumophila* と混合培養し、食胞内に *L. pneumophila* を取り込んでも、食胞内は正常に酸性化していることがわかった (Fig.6, CD, 下段)。また、48 時間後の DAPI

染色像でも、細胞質に脱出している *L. pneumophila* はまったく観察されず、*B. japonicum* については、コントロールとして用いた、48 時間後の食胞内の *K. pneumoniae* と同様に、細胞形態が崩れた *L. pneumophila* が観察された (Fig.6, E)。

これらの結果から、*L. pneumophila* が *T. thermophila* および *P. caudatum* の食胞内に取りこまれると、マクロファージの場合と同様に、食胞内の酸性化が阻害され、その後のライソソームの融合も阻害されると考えられる。その結果、アシドホスファターゼ活性は働かないか活性が低いままで、*L. pneumophila* も消化されずに、細胞内で増殖を続けるか、不完全な消化のまま細胞肛門より排出される可能性が高い。一方、*D. nasutum* と *B. japonicum* は、*L. pneumophila* の寄生に対抗できる能力を持っており、実際に *B. japonicum* は、*L. pneumophila* との混合培養で、培養を続けることができ、DAPI 染色による観察でも、寄生している細胞は発見できなかった。現在、*B. japonicum* が、*L. pneumophila* に寄生されないかどうかを、抗レジオネラ抗体を用いて確認しており、寄生が成立しないことを完全に確認できれば、実地試験を行い、天敵生物を用いた *Legionella* 対策として実用化したい。

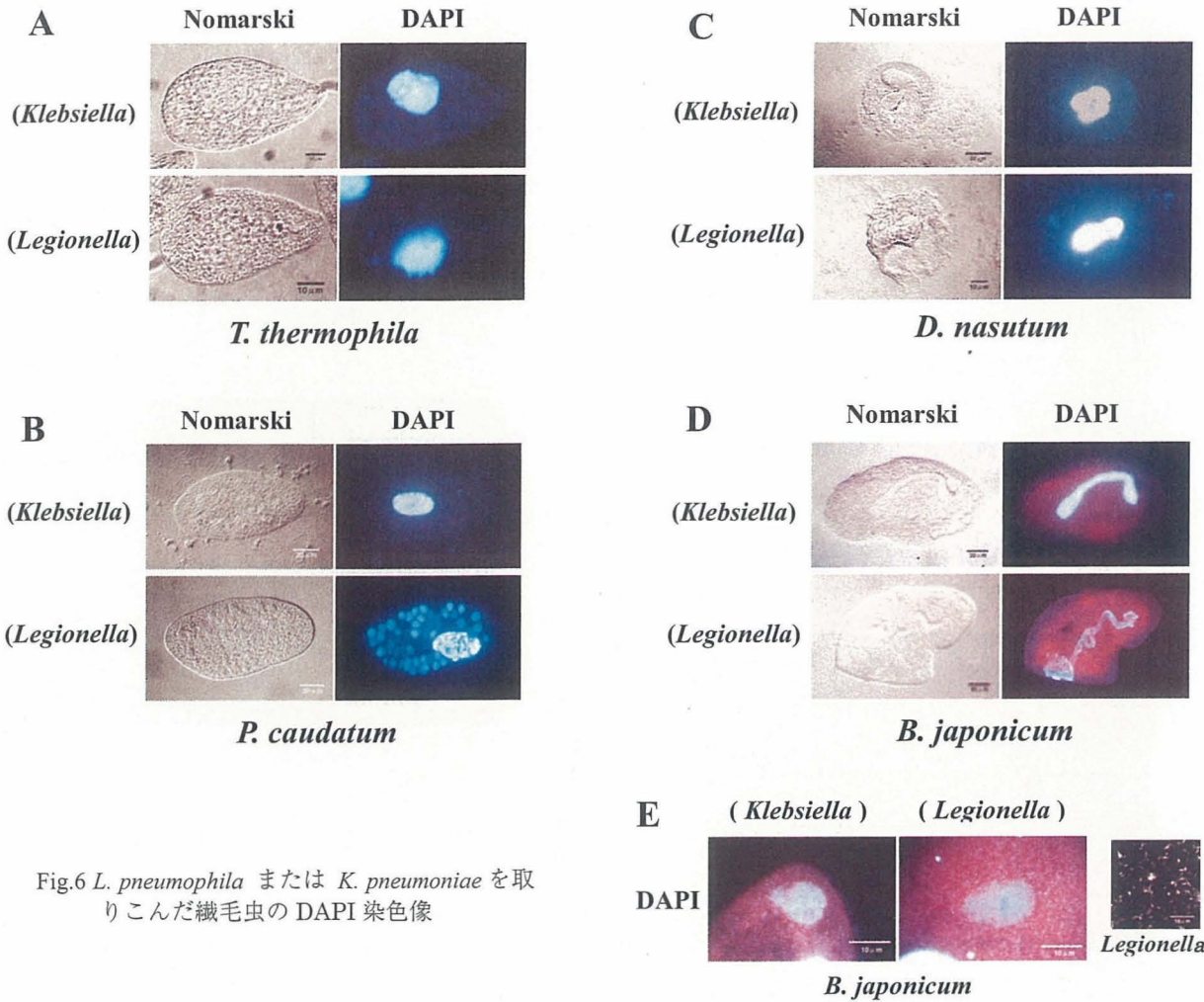


Fig.6 *L. pneumophila* または *K. pneumoniae* を取りこんだ繊毛虫の DAPI 染色像

産業技術への貢献

農業分野における害虫対策には、生物の食物連鎖が利用されているが、微生物レベルでの天敵生物、とくに病原性細菌の処理に原生動物を用いた方法はこれまでにない。特に、*D. nastum* や *B. japonicum* は、バクテリア以外にも、*Tetrahymena* 等の小型原生動物を捕食するため、クーリングタワー内で *L. pneumophila* の寄生宿主も同時に処理することができる。また、環境条件を調整すれば活動を停止し細胞表面に硬い殻を作ってシスト化する。シスト化した細胞は、乾燥や温度変化に強いいため、長期保存が可能であり、細胞をペレット状にして循環水に添加することも可能となる。も

ちろん、*D. nastum* と *B. japonicum* は、池や河川などの淡水中に一般的に存在する繊毛虫で、病原性や毒物分泌等は認められていない。繊毛虫による *Legionella* 処理法は、適切に行うことが困難な薬品処理に代わって、簡便で維持費がかからず、地球環境および人体に対して安全な処理方法となる。

連絡先

電話 083-933-5721 (藤島研究室)
FAX 083-933-5712 (藤島研究室)
E-mail: manabu@po.cc.yamaguchi-u.ac.jp