Osaka University Knowledge Archive

Title	市中感染の危険性予測を目的とした水環境中のLegionella属菌の生理活性評価
Author(s)	奥野, 登志広
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46523
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【19】

氏　　名	奥　野　登志広（おく の と し ひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　２０２５７　号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学　位　論　文　名	**市中感染の危険性予測を目的とした水環境中の *Legionella* 属菌の生理活性評価**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　那須　正夫 （副査） 教　授　八木　清仁　　教　授　土井　健史　　教　授　本田　武司

論　文　内　容　の　要　旨

Legionella 属菌は、起因菌を含む水飛沫などを吸入することにより、ヒトに感染・発症する。市中には、水飛沫の発生源が多数存在するため、日常生活において、*Legionella* 属菌に暴露される可能性がある。したがって、市中の水環境における *Legionella* 属菌の生態を知ることは、日常生活における感染症の予防にとって、非常に重要であると言える。そして、その生態を理解するためには、現存量・生理活性に関する定量的解析が必要である。

これまで、*Legionella* 属菌の生態は主に培養法をもとに研究が行われてきた。しかし、培養法では、培養困難な状態にある細胞を捉えることができず、また、検出に時間を要するため、それぞれの環境における増殖活性を正確に捉えることはできていなかった。本研究では、*gyrB* mRNA と 16S rRNA の発現量を real-time PCR を用いて測定し、*Legionella* 属菌の生理活性の指標とした。DNA 複製に関与する酵素をコードする遺伝子である *gyrB* の mRNA 発現量は、生理活性のうち増殖活性を反映することが他の細菌で知られている。すなわち、*gyrB* mRNA の発現は *Legionella* 属菌の増殖活性の指標となる。また、16S rRNA は、蛋白質合成に必須の RNA であり、細菌の生命活動を営む上で不可欠である。よって、16S rRNA の発現は、生命活動を営む能力のある細菌、つまり生理活性を有する細菌の指標となる。そこで、本研究では *gyrB* mRNA および 16S rRNA の発現量を基に、活性を有する *Legionella* 属菌の定量を試みた。研究にあたっては、*Legionella* 属菌のなかで、感染症の報告例が多く、特に重要な細菌種である、*L. pneumophila* を標的とした。

まず、本研究で新たに作成したプライマー・プローブの配列と系統学的に近縁種の *gyrB* 遺伝子の配列との間で、異なる塩基の数を求めた。その結果、*L. pneumophila* 特異的なプライマーおよびプローブであることがわかった。また、PCR を行い、非特異的な産物が増幅しないことを確認した。さらに real-time PCR を行い、*gyrB* 遺伝子および *gyrB* mRNA の定量における本プライマーおよびプローブの有効性を確認した。

次に、これら遺伝子の発現量が *Legionella* 属菌の増殖活性や生理活性の指標として有効であるか調べた。増殖に伴う mRNA や 16S rRNA の発現量の変化を明らかにするために、*L. pneumophila* を液体培地で培養し、対数増殖初期、対数増殖期、対数増殖終了時、定常期の培養液から DNA および RNA を抽出した。抽出液中の各遺伝子の DNA および RNA 量は real-time PCR を用いて測定し、各増殖段階におけるコピー数を求めた。RNA と DNA のコピー数の比は、*gyrB*、16S rRNA ともに、様々な増殖段階のうち対数増殖期において、細胞あたりの発現量が最も多かった。*gyrB*

mRNA の発現量は、対数増殖期の終了とともに大きく減少しており、*gyrB* 遺伝子の発現量は *L. pneumophila* の増殖段階を反映していることがわかった。一方、16S rRNA 量は対数増殖期終了後も、多少の減少はあるものの、維持されていた。そこで、対数増殖終了後の細胞内 rRNA 含量の変化をより長い時間にわたって追跡した。10 日間の培養後においても、RNA と DNA の比は対数増殖期よりは減少するものの、定常期に入って以降はほぼ一定の値であった。これは、*Legionella* 属菌が生息するにあたり、常に一定量の rRNA を保持していることに起因するものと考えられる。よって、水環境中の 16S rRNA 量と 16S rDNA 量の比を求めることで、*Legionella* 属菌の生理状態の変化を捉えることが可能であることがわかった。

次に、本手法を用いて、様々な水環境における *Legionella* 属菌の増殖活性・生理活性を評価した。本研究では池の表層水、噴水、冷却塔の冷却水を対象とした。各試料中の RNA 量を定量したところ、池の表層水、および冷却水から 16S rRNA を検出した。そこで、16S rRNA と 16S rDNA のコピー数の比を求めたところ、池の表層水で 1.6×10^2、冷却水で 2.8×10^3 であった。池の表層水と冷却水では、*Legionella* 属菌の遺伝子量は同じであったが、冷却塔の方が *Legionella* 属菌は高い生理活性を有していることがわかった。仮に、rRNA を発現している細胞が全て対数増殖期であるとすると、試料中の *Legionella* 属菌の 2.3%（池）、40%（冷却水）が対数増殖期であり、残りの細胞は RNA を発現していないという計算になる。また、試料 1 ml 中の *Legionella* 属菌の数は、ともに 3.7×10^2 個であった。よって、池の表層水、および冷却水 1 ml 中の RNA を発現している *Legionella* 属菌の数は、それぞれ 8.4、および 1.5×10^2 個となる。実際には、環境中には様々な増殖段階の細菌がいると考えられ、それ以上の数の細菌が 16S rRNA を発現している、つまり生理活性を有していることになる。また、同時に従来法である培養法により *Legionella* 属菌数を求めた。池の表層水からは培養法では検出されず、また冷却水においても、real-time PCR の結果から予測した値に比べ低かった。

以上のことから、本手法が環境試料中の生理活性を有する *Legionella* 属菌の定量に有効であり、環境中には従来法では検出できていなかった、生理活性を有する *Legionella* 属菌が存在することがわかった。従って、感染の防止に向け、生態の解明とともに、よりよい安全基準を作成し、様々な水環境を管理していく必要がある。*L. pneumophila* の *gyrB* mRNA 量と DNA 量の比を求めることにより、*L. pneumophila* の増殖活性評価を可能とした。本手法により、環境中の *L. pneumophila* の増殖活性を正確に捉えることが可能である。また、16S rRNA の発現量を求めることにより、生理活性を有するにもかかわらず従来法では培養できない状態の *Legionella* 属菌を、より高精度に検出することが可能である。現在のところ、生理活性を有する *Legionella* 属菌の数と感染症の発症との関係は明確ではない。しかしながら、*Legionella* 属菌は環境中に広く分布するため、今後モデル実験や疫学調査等を通じて *Legionella* 属菌の量および生理活性と、感染・発症の関係を明らかにすることが必要となる。その際、本研究で確立した手法が有用なものとなる。

論文審査の結果の要旨

呼吸器感染症は、起因菌を含む水飛沫などを吸入することにより、ヒトに感染・発症する。市中には、水飛沫の発生源が多数存在するため、日常において呼吸器感染症起因菌に曝露される可能性がある。したがって市中感染を防ぐうえで、起因菌の生態を理解することが重要である。

Legionella 属菌は、水圏に幅広く分布する細菌であり、肺炎やポンティアック熱を引き起こす。市中肺炎の約 10% を占めており、日本国内では入浴施設における集団感染も報告されている。本属菌による感染症を予防するうえで、その生態を理解することが重要である。これまで *Legionella* 属菌の生態は培養法をもとに研究されてきた。さらにマイクロコロニー法の利用により、水圏に生息する本属菌の現存量を高精度に知ることが可能となってきている。

本研究は、実環境中における *Legionella* 属菌の生理状態を明らかにすることを目的とし、細菌の DNA 複製に関与する *gyrB* 遺伝子および蛋白質合成に関与する 16S rRNA 遺伝子の発現と細菌の生理状態との関係について検討したものである。その成果として、*gyrB* 遺伝子は、対数増殖期には DNA 1 コピーあたり約 1 コピーの mRNA が細胞内に存在するのに対し、定常期では発現量が 100 分の 1 以下に低下することを明らかにした。一方 16S rRNA 遺伝子で

は、対数増殖期にはDNA1コピーあたり約7,000コピーのrRNAが存在し、定常期には発現量が約10分の1に低下し、その細胞内量は10日間ほぼ一定であった。すなわち*Legionella*属菌の生理状態の変化に伴いこれら遺伝子の発現量が異なること、特に*gyrB*遺伝子の発現が、本属菌の増殖活性の指標となることを明確に示した。さらに、池、噴水および冷却塔水における*gyrB*および16S rRNA遺伝子量および発現量を求めたところ、池および冷却塔水中には約400 cells/mlの本属菌が存在し、その生理活性は池に比べ、冷却塔水に生息する*Legionella*属菌のほうが高いことがわかった。

本研究は、実環境における呼吸器感染症原因菌の生理状態を明らかにした先駆的な研究であり、得られた成果は、*Legionella*属菌の生態の理解、さらに感染予防に寄与することから、博士（薬学）の学位に値するものと判断する。