

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第 号	氏 名	小 西 忠 司
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	牧 野 芳 大	(牧野)
	副査氏名	門 田 淳 一	(門田)
	副査氏名	下 田 恵	(下田)

Influence of Temperature on Growth of *Legionella pneumophila* Biofilm Determined by Precise Temperature Gradient Incubator

(精密な温度勾配インキュベータによって決定されたレジオネラ・ニューモフィラのバイオフィルムの成長に与える温度の影響)

論文掲載雑誌 Journal of Bioscience and Bioengineering, 101(6), 478-484, 2006

論文の要旨

細菌の培養温度は菌の増殖や形態形成に影響する。本研究では±0.1°Cの精度をもつ温度勾配インキュベータを製作し、*Legionella pneumophila* 血清型1型の3株(ATCC 33152株および臨床分離株の沖縄02-001株、長崎80-045株)を培養温度30.0~47.0°Cの範囲で、0.5°C刻みの温度勾配中で培養し、菌の増殖、菌の大きさおよびバイオフィルムの形態を光学顕微鏡および走査電子顕微鏡を用いて検討した。

L. pneumophila を BCYE- α 培地中で48h培養し、その菌長を顕微鏡下で計測した。菌の長さの平均が50 μ m以上となったのはATCC株は39.0~44.0°C、沖縄株は41.0~43.0°Cで、最長となったのはいずれも42.5°Cで培養した場合であり、それぞれ115 μ m、70 μ mであった。沖縄株の方がより高い温度まで菌の二分能を保有していた。35.0°C~43.0°Cの範囲では液体培地中の菌が寒天培地中の菌より長くなった。培養温度と菌の増殖との関係を見ると、ATCC株、沖縄株共に43.1°Cまでは全ての寒天培地でコロニーが増殖したが、44.1°Cになるとコロニーを形成したものはATCC株では59.1%、沖縄株では68.2%であった。44.1°Cを超えるとATCC株は100%の培地でコロニー形成不能、沖縄株は88.9%がコロニー不能となった。長崎株は沖縄株と同様の結果であった。次に培養温度とバイオフィルム形成との関係を検討した。沖縄株をBCYE- α broth中で42.0°Cで培養しガラス壁面に付着したバイオフィルムを観察した。培養24h後にはair-liquid interface (ALI) 上方のガラス壁面に厚いバイオフィルム、下方に顆粒状のバイオフィルムが形成された。48時間後にはALIの上方3mmに厚いバイオフィルム、下方に0.2-0.5mmピッチのメッシュ状構造のバイオフィルムが形成された。培養72h後には3層の不均一なバイオフィルムが形成され、その下層は直径0.2-0.5mmの顆粒状バイオフィルム、中間層は2-3mmの厚いバイオフィルム、上層は表面に1-3mmの薄いバイオフィルムを形成した。バイオフィルムの厚さは上・中・下層で異なっていたが構造はいずれも繊維状で差異は見られなかった。バイオフィルムの上端は上層の薄膜に伸び培養液表面に接し、下層は培養液中の顆粒層まで伸びていた。菌はバイオフィルム上層の空気と接する部分に多く、中間層に少なかった。一方、菌を35°Cで72h培養した場合、ガラス面のバイオフィルム形成は少なく、ALI付近や下方の菌は無構造の粘液性物質に包まれ互いに連結していた。44.5°C以上では全ての菌は死滅しバイオフィルムの形成も見られなかった。

本論文は精密な温度勾配インキュベータを申請者自身が製作し、それを用い培養温度が*L. pneumophila*の増殖、菌の大きさ、バイオフィルムの形態に及ぼす影響を詳細に報告したものである。これらの知見は温水を利用する際の温度管理、衛生管理の基準を定める際に重要な情報を提供するものであり、審査委員の合議により、本論文は学位論文に値するものと判定した。

学 位 論 文 要 旨

氏名 小西 忠司

論 文 題 目

Influence of Temperature on Growth of *Legionella pneumophila* Biofilm Determined by Precise Temperature Gradient Incubator

(精密な温度勾配インキュベータによって決定されたレジオネラ・ニューモフィラのバイオフィルムの成長に与える温度の影響)

要 旨

ア) 緒言:レジオネラ属菌は、広く環境中に分布するグラム陰性桿菌で、ポンティアック熱やレジオネラ肺炎を引き起こす。レジオネラ症は、1976年米国フィラデルフィア市における集団発生に端を発し、わが国では1981年に長崎でレジオネラ肺炎の最初の症例が報告されている。現在では、成人の市中肺炎の3.9%を占めており、感染症法で第四類全数把握感染症に分類されている新興感染症である。レジオネラ属菌は、循環式浴槽、冷却塔等の人工水環境中に侵入すると、そこに生息するアメーバなどの原虫類に寄生・増殖し、何らかの要因で発生したレジオネラ属菌を含むエアロゾルを人が吸入することにより感染が起こる。また、レジオネラ属菌は、配管内部や濾過材に形成される生物膜(バイオフィルム)に保護されて生存し、最近の研究ではレジオネラ属菌自身がバイオフィルムを形成しているとも報告されている。本研究は、精密な温度勾配インキュベータを用いて、レジオネラ属菌自身が形成するバイオフィルムの形態及び生存に与える温度の影響を調べた。臨床分離株と標準株に対する培養温度と菌長の関係、菌長に与える培地の影響、成育可能温度、バイオフィルム形態に与える温度の影響を報告する。

イ) 研究対象及び方法：研究対象は、いずれも *L. pneumophila* 血清型 1 で、標準株は Philadelphia 1 (ATCC33152)、臨床分離株は 1980 年～2002 年に分離、保存された 3 株 (沖縄 02-001, 沖縄 02-003, 長崎 80-045) である。培養は、buffered charcoal yeast extract with α -ketoglutarate (BCYE- α) 固形培地及び液体培地を用い、標準温度計で熱電対の温度補正を行うことにより、連続運転 48 時間の温度変動を $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 以内にした自作温度勾配インキュベータで実施した。バイオフィルムの形態観察は、光学顕微鏡及び電子顕微鏡で行った。

ウ) 結果：1. 平均菌長が $50\mu\text{m}$ を超える温度範囲は、 $39.0\sim 44.0^\circ\text{C}$ (ATCC33152), $41.0\sim 43.0^\circ\text{C}$ (沖縄 02-001), 最大平均菌長は、 42.5°C で $115\mu\text{m}$ (ATCC33152), 42.5°C で $70\mu\text{m}$ (沖縄 02-001) であった。2. 温度範囲 $35.0^\circ\text{C}\sim 43.0^\circ\text{C}$ において BCYE- α 液体培地の菌長は、固形培地よりも長く、 43.0°C (ATCC33152) と 38.5°C (沖縄 02-001) で固形培地と液体培地に大きな差が認められた。3. ATCC33152 は、 $41.0\sim 43.1^\circ\text{C}$ (100% 成育), $43.1\sim 44.1^\circ\text{C}$ (59% 成育), $44.1^\circ\text{C}\sim$ (成育不能), 沖縄 02-001 は、 $41.0\sim 43.0^\circ\text{C}$ (100% 成育), $43.1\sim 44.1^\circ\text{C}$ (68% 成育), $44.1^\circ\text{C}\sim$ (11% 成育) であった。4. 35°C と 42°C の液体培地における沖縄 02-001 のバイオフィルム形態について、 35°C では粘着性のあるアモルファス様物質で菌間が連結して壁面に付着していたが、 42°C ではフィラメント状の菌が網目構造を形成して付着していた。

エ) 考察：1. 42°C の液体培地の気液界面において、フィラメント状の菌が網目構造を形成するバイオフィルム形態は、capillary 効果による栄養素の吸収を可能にするレジオネラ属菌の生存戦略の一つである可能性が考えられる。2. $35\sim 37^\circ\text{C}$ の固形培地において *L. pneumophila* の二分分裂阻害が始まり、 44°C まで温度上昇と共に平均菌長が比例して増加する。細胞分裂の阻害は *fts* 変異として FtsZ 蛋白等の関与が報告されているが、菌長が温度に比例する要因として、分裂に与える熱運動エネルギーの関与が考えられる。

オ) 結語：精密な温度勾配インキュベータを用い、レジオネラ属菌自身が形成するバイオフィルムの形態及び生存に与える温度の影響を、標準株および臨床分離株について相違を明らかにした。今後、高温における二分分裂阻害による菌の伸長化に対する *fts* 変異等の分子生物学的及び熱力学的検討、フィラメント状の菌が網目構造を形成して付着するバイオフィルム形態に対するその機能及び形成過程について分子生物学的及び熱物質移動・流体工学的検討が必要である。