

- 5) 滝本英樹、本間 栄、川畑雅照、岸 一馬、坪井永保、成井浩司、中谷龍王、中田絃一郎、稲川祐子、館田一博、山口恵三: *Legionella pneumophila* serogroup-9による激症肺炎の一例. 日本感染症学会総会.札幌、1997、4
- 6) 遠藤日奈子、岩田守弘、榎谷綾子 他: レジオネラ肺炎診断における各種検査法の特徴と有用性の比較. 日本臨床微生物学会総会. 東京、1998.2
- 7) 館田一博、村上日奈子、石井良和、松本哲哉、宮崎修一、山口恵三: レジオネラ肺炎の診断学的・臨床的特徴に関する検討. 日本細菌学会関東支部総会. 東京、1998、11
- 8) 館田一博、松本哲哉、古谷信彦、辻本志朗、山口恵三: レジオネラ肺炎患者における胸部X線の解析. -潜在する間質性肺病変・線維化の可能性-. 感染症学会総会. 大阪、1998、4

# 蛍光染色法によるレジオネラ属細菌の検出法

分担研究者：

聖マリアンナ医科大学微生物学講座

嶋田甚五郎

研究協力者：

聖マリアンナ医科大学微生物学講座

山本啓之、賀来満夫、竹村 弘

Fluorescent staining methods for determination of legionellae cells

*Jingoro Shimada, Hiroyuki Yamamoto, Mituso Kaku, Hiromu Takemura*

*Department of Microbiology, St. Marianna University School of Medicine*

## 研究要旨

環境の*Legionella*属細菌を調査では、検査法により菌数や陽性判定の結果に違いが生じる。これはレジオネラに限った現象ではなく、多くの細菌で観察されてきたviable but non-culturable cell (VNC or VBNC) 菌体に起因する。この培養不能な菌体を含めて*Legionella*属細菌を検出する方法として種々の蛍光染色を検討した。



## 目 的

分離培養に依存しない微生物検出方法には、抗原検出、遺伝子検出、生理活性検出の3種類が使われている。古典的な方法では定性的な結果しか得ることができないが、フィルター捕集と蛍光顕微鏡観察を併用すると試料中の菌数を算出できる。また複数の検出原理による検査法で調べることにより *Legionella* 属細菌の環境中での動態を精確に把握できるものとする。本報告では、細胞生理やVNCの研究また検出同定などにおいて広く使われている様々な蛍光染色法（蛍光抗体、呼吸活性、エステラーゼ活性、核酸染色、rRNA-FISH）による *Legionella* 属細菌の検出方法を検討し、蛍光顕微鏡観察における有効性を調べた。



## 材料と方法

### 1. フィルター捕集法

試料のろ過には、ポリカーボネート製の黒色フィルター（GTBP, 孔径0.2  $\mu$ m, Millipore）を使用した。ろ過した試料の容量、フィルターのろ過面積、顕微鏡の視野面積、視野において計数した菌体数から試料中の菌数を算出した。

### 2. 蛍光抗体染色

蛍光抗体染色は間接法を用いた。一次抗体には *Legionella* 属細菌の群型別血清（デンカ生研）を、二次抗体にはCy5標識抗体を使用した。蛍光抗体染色をした後、4'-6-diamidino-2-phenylindole (0.1  $\mu$ g/ml; DAPI) で対比染色した。蛍光抗体染色用の試料は中性ホルマリン（50% formalin in 45 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 28 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>）またはパラホルムアルデヒド（4% paraformaldehyde in PBS）により固定した。

### 3. エステラーゼ活性<sup>5)</sup>

エステラーゼ活性を保有する菌体は蛍光基質（carboxyl fluorescein diacetate; CFDA, mixed

isomers, Molecular Probes Inc.）により検出した。CFDAはアセトンに1 mg/mlの濃度で溶解して-20℃にて保存した。菌体をTris buffer (0.1 M Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA 2Na, pH 8.0) に懸濁し、CFDAを1/10量添加して30℃で90分培養する。培養後の試料に1/10量の中性ホルマリンを加え、菌体をフィルター捕集して乾燥後、無蛍光オイルでフィルターを封入し、蛍光顕微鏡（励起波長; 495nm、蛍光波長; 520nm）により菌数を測定した。

### 4. 呼吸活性<sup>3)</sup>

菌体の呼吸活性はテトラゾリウム化合物（5-cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride; CTC, Polysciences, Inc.）により検出した。CTCは細胞内において電子伝達系により還元されて赤色蛍光を発するformazanの結晶を析出する。菌体を遠心分離（10000 xg, 2 min）により回収し、沈渣を反応溶液（10 mM Tris-HCl; pH 7.2, 1 mM EDTA 2Na; pH 8.0, 10  $\mu$ M Meldran's Blue, and 0.1% CTC）に懸濁する。さらに1/10量のBCYE培地を加え30℃で3時間培養する。培養後の試料に1/10量の中性ホルマリンとDAPI（最終濃度; 5  $\mu$ g/ml）を加え、菌体をフィルターに捕集して乾燥後、無蛍光グリセリンでフィルターを封入し、蛍光顕微鏡により菌数を測定した。DAPI（励起波長; 372 nm、蛍光波長; 456 nm）による青色蛍光とCTC-formazanの赤色粒子（励起波長; 488 nm、蛍光波長; 602 nm）が確認できた細胞を呼吸活性陽性とした。

### 5. DNA/RNA 識別染色<sup>4)</sup>

菌体のDNAとRNAを蛍光色素（acridine orange; AO, Polysciences, Inc.）により識別染色して増殖活性を推定することができる。試料（1 ml）を酸性溶液（1.5 ml; 80 mM HCl, 150 mM NaCl）と混合する。次に色素液（6ml; acridine orange 12  $\mu$ g/ml in the buffer; 0.2 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM citric acid, 1 mM EDTA 2Na, 150 mM NaCl, pH 6.0）を混合して3分間放置する。菌体をフィルターに捕集して乾燥後、無蛍光グリセリンでフィルターを封入し、蛍光顕微鏡により菌数を測定する。AO（励起波長; 490 nm）は二本鎖DNAと結合すると緑色蛍光（530 nm）を、一本鎖RNAと

結合すると橙色蛍光 (640 nm) の蛍光を発する。

6. 蛍光色素標識DNAプローブ染色<sup>1, 2)</sup>

FISH法 (Fluorescence in situ Hybridization) は、蛍光DNAプローブを直接細胞内で標的遺伝子に結合させる方法である。細菌を対象とした場合、標的はリボソームのRNAである。*Legionella*属細菌を検出するため16S rRNAの特異配列と結合するDNAプローブ (LEG705; 5' CTG GTG TTC CTT CCG ATC 3') を合成した。

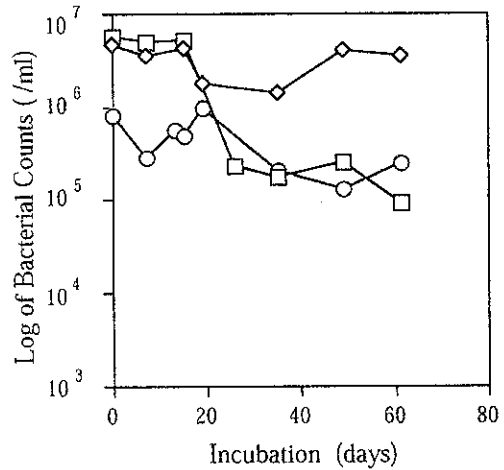
試料はパラホルムアルデヒドで固定した後50-55%エタノールに置換して-20℃で保存した。1%ゼラチンをコートしたスライドガラスに試料を広げて乾燥させた後、90%エタノールで試料面をリンスする。蛍光DNAプローブをハイブリダイゼーション液 (0.9 M NaCl, 0.01% SDS, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) に1-5 μg/μlの濃度で混合し、試料面に滴下して湿潤箱に納め43℃で1-3時間放置した。スライドガラスを43℃に保温した洗浄液 (20 mM Tris-HCl [pH 7.6], 0.01% SDS, 5 mM EDTA, 160 mM NaCl) に20分間浸漬した後、蒸留水で洗浄してDAPI溶液 (0.1 μg/ml) で5分間染色した。スライドガラスは蒸留水で洗浄して乾燥させた後、蛍光顕微鏡で観察した。

結果

栄養飢餓状態と対数増殖期の *Legionella pneumophila* について菌体の染色性を調べた (図1、2)。実験に供した *L. pneumophila* はすべての方法で染色されたが、呼吸活性を検出するCTCについては染色結果を蛍光顕微鏡で検出できない場合が認められた。またエステラーゼ活性の基質であるCFDAは対数増殖期の菌体で取り込まれなくなる傾向が見られた (図2)。

RNAの識別染色 (図3) では、増殖期においてRNA量が大きく橙色蛍光を呈する菌体がコロニー数とともに増加した。しかし定常期になると橙色蛍光を呈する菌体数はコロニー数よりも低い値を示した。栄養飢餓にさらした場合には、コロニー数と橙色蛍光の菌体数は一致を示した。

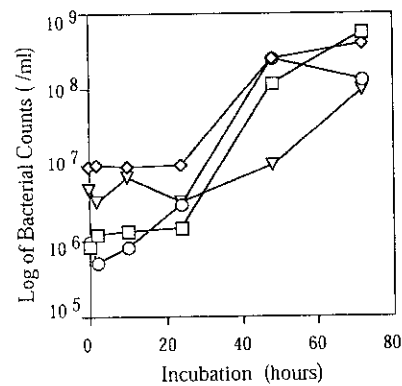
図1



◆ Total direct count    □ Colony count  
○ RNA-rich cell count

栄養飢餓状態における *L. pneumophila* の菌数変動

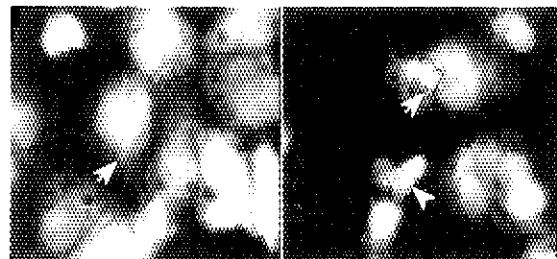
図2



□ Colony count    ○ RNA-rich cell count  
◆ Total direct count    ▽ Esterase-positive cell count

増殖期における *L. pneumophila* の菌数変動

図3



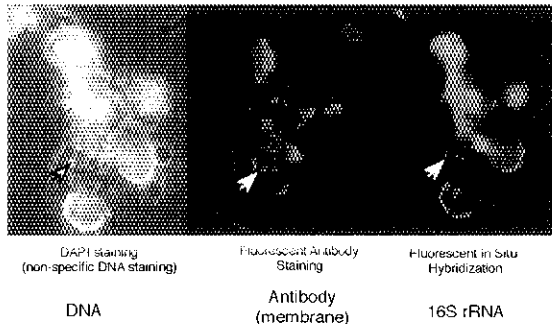
1 hour after inoculation    24 hour after inoculation

培養細胞内 *L. pneumophila* のAO染色

\*写真では橙色から黄色蛍光を示すのがRNAである。

FISH法による染色では増殖期にある *L. pneumophila* 菌体だけが特異的な蛍光を示した。培養細胞に感染させた *L. pneumophila* をDNAプローブで染色した後に間接蛍光抗体法により染色したところ、細胞内に存在する菌体はDNAプローブと蛍光抗体いずれの方法でも検出できた(図4)。

図4



培養細胞内 *L. pneumophila* の多重染色

\* 菌接種後24時間の培養結果である。菌体は矢印で示した。

考 察

蛍光抗体染色やDNA染色では微生物の存在は確認できるが、その生理状態を推定できない。これに対して酵素活性、呼吸、RNA量は発育増殖に直接関与する生体物質であることから「生きている細胞」を検出するのに有効な指標であると考えられる。しかし検出に使用する蛍光基質の多くは合成物であるため期待されるような細胞内への取り込みが認められないことがある。結果にも示されるようにエステラーゼ活性の基質であるCFDAは増殖期にある細菌細胞へ効果的に移行しない。また呼吸活性を検出測定するCTCは *L. pneumophila* での反応性が弱く、肉眼的に検出できるformazan結晶を細胞内に形成しない。特定の菌種、限られた実験条件下では有効な方法であるが、実際の試料や検体にこれらの方法を応用するには、基質の分子構造の検討や反応条件を改良するなどの問題を解決する必要がある。

細胞内RNA量は細菌の増殖と相関する生体物質のひとつである。ここで使用した識別染色法ではm

RNAとrRNAを主に検出している。実験に供した *L. pneumophila* では対数増殖期の後期よりRNA量が減少した菌体がコロニー数より少なくなることが認められた。この現象は *Escherichia coli* などの場合には観察されない。これはリボソーム量の調節機構の違いに起因すると考えられる。リボソーム量に依存するFISH法において活発に増殖する菌体だけが強い蛍光を示したのもこれが原因と考えられる。

*L. pneumophila* ではRNA量が少ない菌体でも増殖能力を維持しており、RNA量だけを指標として生菌か死菌を判定することは困難である。しかし試料中にRNA量の多い菌体が見つかる場合は活発に増殖していることを裏付けており、実際の調査においては有用な情報を提供できるであろう。

RNA識別染色法とFISH法から得られる結果は同等である。技術的な簡便性では識別染色法が優れ、検出結果の特異性ではFISH法が優れている。これらの生理活性やRNA量を指標とした染色法に蛍光抗体などを組み合わせた多重染色の手法を用いれば、ひとつの顕微鏡視野において複数の情報をとることが可能である。*Legionella* 属細菌のように分離培養が困難な細菌を検出同定する方法として蛍光染色法は有用と考える。


結 論

生理活性やRNA量を指標とする蛍光染色法は *Legionella* 属細菌の検出同定に有効である。ただし生理活性の検出法は実際の試料や検体で使用するには解決すべき問題点がある。RNAを指標とする方法では *Legionella* 属細菌の生菌だけを顕微鏡下で検出することはできないが、多重染色の手法により環境感染の危険性を判定するのに有用な情報をできる。

発 表

学会 : Yamamoto, H., H. Takemura, M. Kaku et al. 1998. Viable but non-culturable cells of

*Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas putida* in multiple-nutrient starvation. The 8th International Symposium on Microbial Ecology, Halifax.

 文 献

- 1) Amann R, Ludwig W, Schleifer K-H: Phylogentic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995;59:143-169.
- 2) Grimm D, Merkert H, Ludwig W, et al: Specific detection of *Legionella pneumophila*: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:2686-2690.
- 3) Stellmach J, Severin E: A fluorescent redox dye. Influence of several substrates and electron carriers on the tetrazolium salt-formazan reaction of *Ehrlich ascites* tumour cells. *Histochem J* 1987;19:21-26.
- 4) Traganos F, Darzynkiewicz Z, Sharpless T, et al: Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system. *J Histochem Cytochem* 1977;25:46-56.
- 5) Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T: Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple -nutrient starvation. *FEMS Mictobiol Ecol* 1996; 20:149-154.
- 6) 山本啓之: *Legionella*属細菌の生態とレジオネラ症. *Microbes and Environments*, 1997; 12:149-156.

# レジオネラ肺炎の予後と補助診断における 血清KL-6の有用性の検討

主任研究者：

琉球大学医学部内科学講座第一

斎藤 厚

研究協力者：

琉球大学医学部内科学講座第一

健山正男、仲本 敦、新垣紀子  
新里 敬、比嘉 太、小出道夫

Evaluation of usefulness of serum KL-6 in prognosis and clinical diagnosis of *Legionella pneumoniae*

Atushi Saito, Masao Tateyama, Atsushi Nakamoto, Noriko Arakaki, Takashi Sinzato, Futoshi Higa, and Michio Koide

First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

## 研究要旨

目的：レジオネラ肺炎での血清KL-6値を一般細菌性肺炎およびレジオネラ肺炎の死亡群と治癒群で比較検討した。

方法：発症より10日以内に採血された血清にてレジオネラ肺炎群15例と一般細菌性肺炎群11例のKL-6値を測定し比較検討した。またレジオネラ肺炎患者の治癒群12例と死亡群3例の血清KL-6値を比較検討した。

結果：血清KL-6値のレジオネラ肺炎群の平均値は517.0 U/mlと一般細菌性肺炎群の192.7 U/mlに比較して有意に血清KL-6の上昇を認めた( $p=0.0182$ )。レジオネラ肺炎の死亡群と治癒群の比較検討では血清KL-6値は死亡群では1300.0 U/mlと治癒群の平均値321.3 U/mlより有意に高かった( $p=0.0093$ )。

結論：レジオネラ肺炎患者の血清KL-6の値は一般細菌性肺炎患者の値と比較して有意な上昇を示し実質性肺炎における鑑別診断の補助診断として有用性が示唆された。レジオネラ肺炎患者の死亡群の血清KL-6値は治癒群の値と比較して有意な上昇を示し、予後の予測因子として有用な視標となることが示唆された。

## 目 的

KL-6は主としてヒトのⅡ型肺胞上皮細胞や呼吸細気管支上皮細胞に発現する糖蛋白質抗原である。1985年河野らによって発見され、KL-6の推移は肺胞上皮細胞の障害と肺胞血管透過性の亢進の程度と平行し<sup>1)</sup>、肺胞領域のリモデリングをきたす疾患の活動性を評価するのに有用とされている。臨床的には間質性肺炎をはじめとした線維化をきたす疾患の活動性の評価に優れた有用性を持つことが報告されている<sup>2, 3)</sup>。

レジオネラ肺炎は異型肺炎として取り扱われることが多いが、その理由としてβ-ラクタム薬が無効で、マクロライド、ミノサイクリンが有効であること、また一般細菌用培地で培養できない、グラム染色で鏡検できないことがあげられる。しかしながらレジオネラ肺炎の臨床症状や検査所見は一般細菌性肺炎と類似することからその鑑別は困難であり、このことが死亡率を高める原因となっている。

我々が行った剖検例におけるレジオネラ肺炎の病理学検討では高率に線維化を認めた<sup>4)</sup>。線維化をきたす肺疾患では血清KL-6値は高値をとり、また一般細菌性肺炎では血清KL-6値は上昇しないことが報告されている<sup>5)</sup>。このことから血清KL-6がレジオネラ肺炎で高値をとれば補助診断として有用性が期待できる。また、呼吸不全と線維化は緊密な関係があることからレジオネラ肺炎の死亡群と治癒群において血清KL-6の動態を測定し、レジオネラ肺炎の予後予測因子としての有用性を検討した。

## 材料と方法

### 1. レジオネラ肺炎および一般細菌性肺炎における血清KL-6値の比較検討

#### 1) 対象患者

1987年～1998年までに当科で診断し、発症推定日より10日以内の血清が得られたレジオネラ肺炎群15例（以下 Lsp: *Legionella* species pneumonia group）と起炎菌が分離同定され、性別、年齢分布、

肺炎スコアの分布、基礎疾患の保有率をLspとマッチさせた一般細菌性肺炎群11例（以下 non-Lsp: non *Legionella* species pneumonia group）を対象とした(表1)。

表1 Background characteristics of the patients

Characteristic		Lsp	non-Lsp	Statistical test
Sex	male	10	9	N S <sup>1)</sup>
	female	5	2	
Age	~29	0	0	N S <sup>1)</sup>
	30~39	1	0	
	40~49	4	1	
	50~59	0	3	
	60~69	5	4	
	70~79	1	2	
	80~	4	1	
mean ± SE		63.1 ± 4.2	64.5 ± 3.0	
Infiltration score of chest X-p	3 ±	2	2	N S <sup>2)</sup>
	4 ± and 7 ±	7	8	
	8 ±	2	2	
Underlying disease and/or complication	Yes	13	9	N S <sup>2)</sup>
	No	2	2	

Lsp: *Legionella* species pneumonia non-Lsp: non *Legionella* species pneumonia

1) ; Fisher's exact probability test

2) ; Chi-square test

Lspの診断は培養陽性が6例、IFA陽性が8例、尿中抗原陽性が1例であった。複数の検査法で陽性となったものは培養、IFA、尿中抗原検出の優先順位で前の検査法を代表として記載した。同定された種では*Legionella pneumophila* serogroup 1が最も多く10例で、*Legionella bozemanii* (2例)、*Legionella dumoffii*が2例、*L. pneumophila* serogroup 3が1例であった。

Non-Lspで分離された菌は*Streptococcus pneumoniae*が6例で最も多く、*Staphylococcus aureus*が3例、*Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*がそれぞれ1例であった。

#### 2) 方法

発症推定日より10日以内の血清KL-6値について両群の比較検討をおこなった。両群の血清KL-6値の有意差検定にはノンパラメトリック検定 (Mann-Whitney' U-test)を用いた。

### 2. 治療群と死亡群における血清KL-6値の検討

#### 1) 対象患者

上述したのと同じ15例のレジオネラ肺炎患者を対象とした。治癒群は12例で、死亡群は3例であった。両群において発症より10日以内に得られた血清より血清KL-6値を測定した。

#### 2) 方法

両群において発症より10日以内に得られた血清よ



りKL-6値を測定した。有意差検定にはノンパラメトリック検定 (Mann-Whitney' U-test)を用いた。

## 結 果

### 1. レジオネラ肺炎および一般細菌性肺炎における血清KL-6値の比較検討

発症より10日以内に採血された血清KL-6値のレジオネラ肺炎群の平均値は517.0 U/mlと一般細菌性肺炎群の192.7 U/mlに比較して有意に血清KL-6の上昇を認めた( $p=0.0182$ ) (図1)。

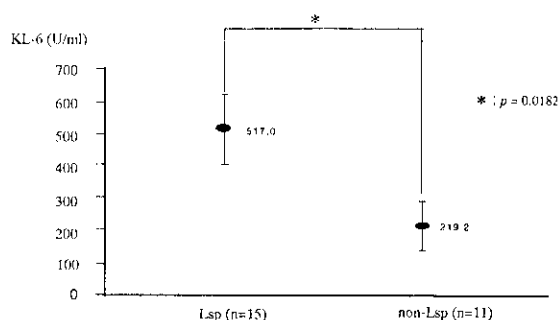


図1 Serum KL-6 levels between Lsp and non-Lsp  
Lsp; *Legionella* species pneumonia group, non-Lsp; non *Legionella* species pneumonia group

### 2. 治療群と死亡群における血清KL-6値の検討

発症より10日以内に採血された血清KL-6値は死亡群では1300.0 U/mlと治療群の平均値321.3 U/mlより有意に高かった( $p=0.0093$ ) (図2)。血清KL-6値は死亡群では発症より20~25日において

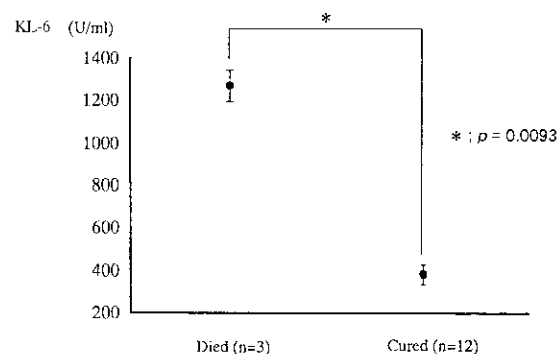


図2 Serum KL-6 levels between died and cured patients in *Legionella* pneumonia

発症時の平均200~300%の増加を認め、以後減少に転じた(データ未提示)。この傾向は治療群でも認められたが上昇の程度は小さく、発症時における血清KL-6値の10~20%増加にとどまった。

## 考 察

肺における線維化進行の必須条件は、肺胞上皮細胞の障害であり、その障害が強ければ、肺胞血管透過性の亢進がもたらされる<sup>1)</sup>。KL-6は、この両者の程度を反映するために、KL-6は肺胞領域のリモデリングをきたす疾患の活動性を評価するのに有用とされる<sup>2, 3)</sup>。

通常細菌性肺炎では線維化は認められないが、我々の検討したレジオネラ肺炎の剖検例の検討では26.8%に認められた。acute fibrinopurulent pneumonia (AFPP)の病理像は97.6%に認められた<sup>4)</sup>。

今回検討した一般細菌性肺炎群11例の血清KL-6値は、平均値は192.7U/mlであり有意な上昇は認められなかった。起炎菌別の血清KL-6の平均値は、*H. influenzae*が496U/mlと最も高く、以下*S. pneumoniae* 221U/ml、*M. catarrhalis* 197U/ml、*S. aureus* 161U/ml、*K. pneumoniae* 127U/mlであった。今回は検討症例数は少ないが、北村らの多施設共同研究による報告でも同様の成績が示されており<sup>5)</sup>、一般細菌性肺炎では血清KL-6は高値をとらないことはほぼ確認されたと思われる。

一方レジオネラ肺炎群では、平均値は517.0U/mlと一般細菌性肺炎群と比較して優位な上昇を認めた。レジオネラ肺炎の診断は培養もしくは抗体価測定によるが<sup>6)</sup>、培養でコロニーを確認できるまでには4~10日を要し<sup>7)</sup>、また有意な抗体価上昇まで日数を要することが臨床における問題点と指摘されている<sup>8)</sup>。本症が病勢の進行が早く重症化しやすいことを勘案すると、本症には早期診断法の確立が求められる。血清KL-6は非特異的に上昇するため確定診断には用いられないが、発症後早期に血清中に認められ、測定も市販キット(ED046キット:エーザイ(株))が販売され簡便に行えることから、レジオネラ肺炎と一般細菌性肺炎の鑑別の補助診断の一つとしてその有用性を検討することは重要と思わ

れる。

レジオネラ肺炎では、発症時より強い低酸素血症が高率に認められ、64～82%が人工呼吸管理を必要とする<sup>9,10)</sup>とされる。我々の施設で診断したレジオネラ肺炎患者48例の検討では、肺泡気・動脈血酸素分圧較差 (AaDO<sub>2</sub>) の平均値は108.4mmHgと著明な開大を認めた。入院時のPaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>の値は急性肺損傷 (acute lung injury: ALI) の定義を満たした300mmHg以下の患者は75%、成人呼吸促進症候群 (adult respiratory distress syndrome: ARDS) の定義を満たした200mmHg以下の患者は40%と多くの患者で重症呼吸不全を呈していた。El-ebiaryらも84例のレジオネラ肺炎を検討しPaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>の平均値は156mmHgと全例がARDSの定義を満たしたと報告している<sup>9)</sup>。以上よりレジオネラ肺炎の剖検例における高率な線維化と血液ガス所見から、低酸素血症の主因は一般細菌性肺炎には認められない線維化であることが推察される。

レジオネラ肺炎の予後予測因子としては、Apach score<sup>9)</sup>、基礎疾患の種類<sup>11)</sup>、発症から抗菌薬投与までの日数などが報告されているが<sup>12)</sup>、現在まで確立した予後予測因子は明らかにされていない。

今回、検討した治療群と死亡群における血清KL-6値の検討では、発症時の測定で血清KL-6値の有意な差を認めた。死亡した3例ではすべて1100 U/ml以上であり、治療群の最高値は642U/mlにとどまった。発症から18日後に測定され今回の検討に含めなかった死亡患者においても、やはり発症時に1123U/mlと高値をとった。今回検討した症例では発症初期に高値をとり、治療に反応して減少した症例は認められなかった。

KL-6が予後予測因子として有用であることが今回の検討で示されたが、発症時においてこのような差を認めたことの病態生理学的な意義付けに関しては今後さらなる検討が必要である。

## 結 論

レジオネラ肺炎患者の血清KL-6の値は一般細菌性肺炎患者の値と比較して有意な上昇を示し実質性肺炎における鑑別診断の補助診断として有用性が示

唆された。

レジオネラ肺炎患者の死亡群の血清KL-6の値は治療群の値と比較して有意な上昇を示し、予後の予測因子として有用な視標となることが示唆された。

## 発 表

学会：

健山正男、仲本 敦、新垣紀子、他：レジオネラ肺炎におけるKL-6の臨床的意義の検討。

第73回感染症学会総会、1999年3月（東京）。

## 文 献

- 1) Inoue Y, Barker E, Daniloff E, et al: Pulmonary epithelial cell injury and alveolar-capillary permeability in berylliosis: Am J Respir Crit Care Med 1997;156:109-115.
- 2) Hirakawa Y, Kohono N, Yokoyama A, et al: KL-6, a human MUC1 mucin, is chemotactic for human fibroblasts: Am J Respir Cell Mol Biol 1997;17:501-507.
- 3) 河野修典：KL-6：呼吸 1997;16:391-398.
- 4) 田代隆良、藤田紀代、斉藤 厚他：Nosocomial pneumoniaとしてみられたレジオネラ症41例の病理学的検討：日胸疾誌 1985;23:456-462.
- 5) 北村 諭、日和田邦男、小林 淳、他：ED046による間質性肺炎症例の血清KL-6値の検討：日胸疾誌1996;34:639-645.
- 6) 上田 泰：レジオネラ肺炎診断基準。日医会誌。1991;105:1150-1151.
- 7) Edelstein PH: Legionnaires' disease. Clin. Infect. Dis. 1993;16:741-749.
- 8) 山城裕子ほか：レジオネラ肺炎の血清診断-当科による最近3年間の検査成績-。感染症誌 1994; 68: 1256-1263.
- 9) El-ebiary M, Sarmiento X, Torred A, et al: Prognostic Factors of Sever Legionella Pneumonia Requiring Admission to ICU. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:1467.

- 10) Riemsdijk IC, Berg B: Sever Legionnaire's disease requiring intensive care treatment. Netherland J Med: 1996;49,196.
- 11) Barbara J, Marston, Harvey B, et al: Surveillance for Legionnaire' Disease, risk factors for morbidity and mortality. Arch Intern Med 1994;154: 2417-2422.
- 12) Heath CH, Grove DI, Looke DFM: Delay in appropriate therapy of *Legionella* pneumonia associated with increased mortality. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;15: 286-290.

# *Legionella pneumophila*の細胞内増殖性の 観察と細胞内MICの測定 -第2報-

分担研究者：

聖マリアンナ医科大学微生物学講座

嶋田甚五郎

研究協力者：

聖マリアンナ医科大学微生物学講座

竹村 弘、山本啓之、賀来満夫

Evaluation of human monocytic cell line THP-1 model for the intracellular activities of antimicrobial agents against *Legionella pneumophila*

Jingoro Shimada, Hiromu Takemura, Hiroyuki Yamamoto, and Mitsuo Kaku  
Department of Microbiology, St. Marianna University School of Medicine

## 研究要旨

*Legionella pneumophila* は細胞内（食胞内）増殖性細菌で、本菌による肺炎は、気道末梢の肺胞マクロファージ等の細胞の中で本菌が増殖することによって惹起される。我々は、ヒト単球由来細胞株である THP-1 を使って各種抗菌薬の *L. pneumophila* に対する細胞内増殖抑制効果を検討した。THP-1 は 10% ウシ胎児血清（FCS）添加 RPMI 1640 にて  $1 \times 10^6$  /ml に調整し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で、24 時間 PMA にて刺激してマクロファージ様に分化させた後、 $5 \times 10^4$  CFU/ml の *L. pneumophila* を感染させた。培養上清中の非感染細菌を、洗浄して取り除いた後、抗菌薬存在下または非存在下で、経時的に培養上清及び付着細胞内の生菌数を計数した。培養上清内および付着細胞内の生菌数を総菌数として、24 時間後の総菌数が抗菌薬非存在下で培養したコントロールの 1% 以下となる最小の濃度を cell associated MIC (CA-MIC) として抗菌薬の *L. pneumophila* の細胞内増殖抑制効果を評価した。CA-MIC と BYE- $\alpha$  液体培地を用いた微量液体希釈法による MIC を比較すると、*L. pneumophila* に対して臨床的に有効とされている rifampicin (RFP)、minocycline (MINO)、マクロライド薬である erythromycin (EM)、clarithromycin (CAM)、azithromycin (AZM)、ニューキノロン薬である ciprofloxacin (CIPFX)、grepafloxacin (GPFX) などは、ほぼ同等の値であった。一方、臨床的には *Legionella* 症に無効とされている  $\beta$ -lactam 薬の、Aminobenzyl penicillin (ABPC)、Cefotiam (CTM) は、MIC は、それぞれ  $0.25 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g/ml}$  であったが、本モデルでは、 $64 \mu\text{g/ml}$  でも *L. pneumophila* の細胞内増殖を抑制しなかった。また、新規抗菌薬である everninomicin は *Legionella* 属菌に対して優れた抗菌力を示し、特に *L. pneumophila* に対しては CIPFX とほぼ同等の優れた MIC を示した。さらに、everninomicin の *L. pneumophila* に対する CA-MIC は  $1 \mu\text{g/ml}$  (128 MIC) で、本薬が *in vivo* でも本菌に対し有効である可能性が示唆された。このように本モデルを使って、抗菌薬の *Legionella* 属に対する細胞内増殖抑制効果を評価することは非常に有意義であると考えられる。

## 目 的

*Legionella pneumophila* は細胞の食胞内で増殖可能な細菌で、本菌による肺炎は、空調設備、加湿器、温泉水等から生じる本菌を含むエアロゾルを吸引し、気道末梢の肺胞マクロファージ等の細胞の中で、菌が増殖することによって惹起されることが知られている<sup>1)</sup>。したがって、治療に際しては抗菌薬の細胞内への移行性が重要で、その効果は必ずしも *in vitro* における最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration; MIC) の結果と一致しない (2-6)。我々は、昨年の本研究会で、ヒト単球由来細胞株である THP-1 を用い、抗菌薬の *L. pneumophila* に対する細胞内増殖抑制効果を検討できる実験モデルについて報告した。今回は、新規抗菌薬である everninomicin を含むより多くの抗菌薬について、さらに検討を加え報告する。

## 材料と方法

供試菌株は、*L. pneumophila*, serogroup 1 の臨床分離株である SMUM-353 で、細胞は、ヒト単球由来細胞株である THP-1 (JCRB0112.1) である。使用した抗菌薬は、Aminobenzyl penicillin (ABPC)、Cefotiam (CTM)、erythromycin (EM)、clarithromycin (CAM)、azithromycin (AZM)、ciprofloxacin (CPFX)、grepafloxacin (GPFX)、clindamycin (CLDM)、rifampicin (RFP)、minocycline (MINO)、および新規抗菌薬である everninomicin である。抗菌薬の *L. pneumophila* に対する MIC は、BYE- $\alpha$  液体培地を用いた微量液体希釈法で測定した。また、everninomicin に関しては、*L. pneumophila*, serogroup 1・6、*L. dumoffii*、*L. bozemanii*、*L. micdadei*、*L. gormanii*、*L. jordanis* の標準菌株に対する MIC を測定した。さらに、MIC を判定した plate より  $10\mu\text{l}$  の培養液を新たに BCYE- $\alpha$  寒天培地に接種し、 $37^\circ\text{C}$ 、72 時間培養後にコロニーの形成が見られない最小の濃度を最小殺菌濃度 (minimal bacteriocidal concentration

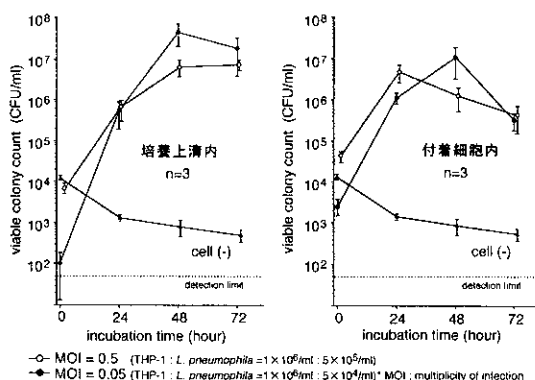
;MBC) とした。THP-1 は 10% FCS 添加 RPMI 1640 液体培地にて  $1 \times 10^6/\text{ml}$  に調整し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下で、24 時間、 $16\text{nM}$  の phorbol 12 myristate 13-acetate (PMA) にて刺激してマクロファージ様に分化させ、24 穴のプラスチック製マイクロプレートに付着細胞させた細胞を使用した。この細胞に、 $5 \times 10^4$  CFU/ml の *L. pneumophila* を添加して、10% FCS 添加 RPMI 1640 液体培地中で 1 時間培養後、培養上清中の非感染細菌を、培養液で 2 回洗浄して取り除いた後、さらに  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下で培養し、培養上清及び付着細胞内の生菌数を経時的に、コロニーカウント法で計数した。付着細胞内の *L. pneumophila* は、培養上清を取り除いた付着細胞に、培養上清と等量 ( $500\mu\text{l}$ ) の ice cold の滅菌蒸留水を添加し 10 分間静置して、細胞を破壊して回収した (この方法では、*L. pneumophila* の viability に影響しない)。各種抗菌薬の細胞内増殖抑制効果は、抗菌薬存在下で同様に培養し、生菌数を計数して評価した。

## 結 果

### 1. 培養上清内、付着細胞内の *L. pneumophila* の生菌数の経時的変化

予備実験の段階で、培養上清中の *L. pneumophila* の生菌数も増加することが判っていたので、以後の実験結果を培養上清内の生菌数と、プレートに付着している細胞、すなわち、付着細胞

FIG. 1 THP-1 細胞における *L. pneumophila* の細胞内増殖



内での生菌数に分けて評価した。培養上清内、付着細胞内での生菌数の経時変化および、本実験で使用した細胞培養液である10%ウシ胎児・清添加RPMI 1640液体培地中で*L. pneumophila*を培養した時の生菌数の経時変化をFIG. 1に示した。細胞培養液のみで*L. pneumophila*を培養した場合、菌の増殖はみられず、むしろ経時的に緩やかに生菌数が減少した。このことより、培養上清中の生菌数の増加は、菌が細胞外で増殖したためではないと考えられた。一方、付着細胞内では、培養開始直後は、 $2 \times 10^2$  CFU/ml程度であったが、24時間培養後には $1 \times 10^6$  CFU/ml、48時間後には $1 \times 10^7$  CFU/ml程度に増加し、72時間後には、むしろ $3 \times 10^8$  CFU/ml程度に減少した。一方、培養上清中の生菌数は、培養開始直後は、 $1 \times 10^2$  CFU/ml程度であるが、その後、付着細胞内と同様の経時変化を示し、72時間後での減少傾向は、付着細胞内の場合よりも軽度で、 $1 \times 10^7$  CFU/ml程度の生菌数であった。

2. 各種抗菌薬の*L. pneumophila* に対する細胞内増殖抑制効果

このモデルを使って*L. pneumophila* の細胞内増殖に対する、抗菌薬の効果を抗菌薬存在下で培養した時の生菌数を経時的に計測することで評価した。FIG.2はマクロライド薬であるEMの場合で、薬剤の濃度依存的に培養上清内及び付着細胞内の生菌数の増加が抑制された。FIG.3はニューキノロン薬であるCPFXの場合で、同様に濃度依存的に*L. pneumophila* の細胞内増殖を抑制した。一方、臨床的にも*Legionella*症に無効とされている $\beta$ -lactam薬である、ABPC、CTMは、それぞれ

FIG. 2 EMの*L. pneumophila* に対する細胞内増殖抑制効果

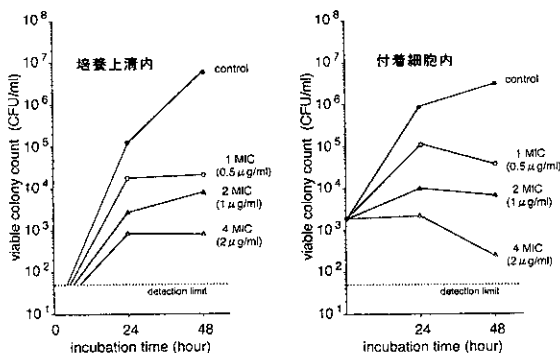


FIG. 3 CPFXの*L. pneumophila* に対する細胞内増殖抑制効果

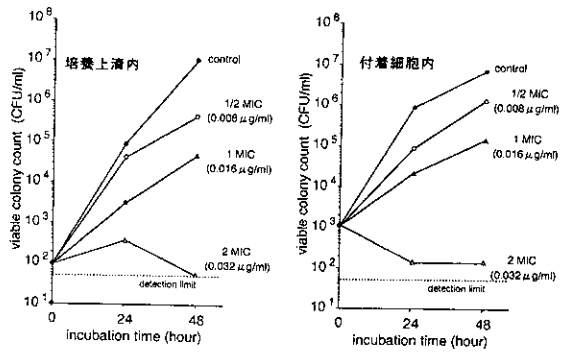
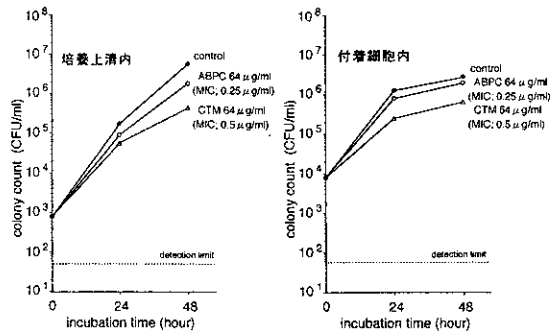


FIG. 4 ABPC, CTMの*L. pneumophila* に対する細胞内増殖抑制効果



$0.25 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ であったが、本モデルでは、 $64 \mu\text{g/ml}$ でも *L. pneumophila* の細胞内増殖を抑制しなかった(FIG.4)。そこで、培養上清内および付着細胞内の生菌数を総菌数として、24時間後の総菌数が抗菌薬を添加していないコントロールの1%以下となる最小の濃度をcell-associated MIC (CA-MIC) としてより多くの抗菌薬の*L. pneumophila*に対する細胞内増殖抑制効果を評価した (Table 1)。臨床的に有効であるマクロライド薬、ニューキノロン薬では、CA-MICと微量液体希

Table 1. 各種抗菌薬の*L. pneumophila* に対する cell associated MIC (CA-MIC)

Agent	MIC <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ )	CA-MIC <sup>b)</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ )	CA-MIC/MIC ratio
Aminobenzyl penicillin	0.25	>64	-
Cefotiam	0.5	>64	-
Erythromycin	0.5	1	2
Clarithromycin	0.032	0.064	2
Azithromycin	0.125	0.125	1
Clindamycin	16	4	1/4
Ciprofloxacin	0.016	0.032	2
Grepafloxacin	0.016	0.008	1/2
Minocycline	1	0.125	1/8
Rifampin	0.00025	0.002	8

a) minimal inhibitory concentration determined by broth dilution method with BYE- $\alpha$   
b) cell associated MIC

釈法によるMICは、ほぼ同等の結果であったが、細胞内移行が特に良いとされているGPFX、CLDM、MINOでは、CA-MICがやや低い値を示した。

### 3. everninomicinの*Legionella*属菌に対する抗菌作用

everninomicinは分子量1631のoligosaccharide系の新規抗菌薬で、MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) やVRE (vancomycin-resistant enterococci) をふくむグラム陽性球菌に対しては広く優れた抗菌力を示すが、一般に多くのグラム陰性桿菌に対しては抗菌活性を示さないという特徴を持っている。このeverninomicinの*Legionella*属菌に対する抗菌作用および細胞内増殖抑制効果を同様の方法で検討した。everninomicinの、*L. pneumophila* serogroup 1・6、*L. dumoffii*、*L. bozemanii*、*L. micdadei*、*L. gormanii*、*L. jordanis*の標準菌株に対するMICおよびMBCをTable 2、Table 3に示した。*L. pneumophila*のserogroup 1・6の標準菌株に対するeverninomicinのMICは0.008-0.064  $\mu\text{g/ml}$ で、この値はCPFXとはほぼ同等で、EMより明らかに優れた値を示した。また、MBCはEMと同様にMICの16・64倍の値を示した。また、他の*Legionella*属菌の標準菌株に対しても、*L. dumoffii* (0.25  $\mu\text{g/ml}$ ) および *L. gormanii* (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) に対してはやや高いMICの値を示したが、ほぼ同様の結果を示した。

### 4. everninomicinの*L. pneumophila* に対する細胞内増殖抑制効果

everninomicinの、*L. pneumophila*に対する細胞内増殖抑制効果を同様の方法で検討した(FIG. 5)。本薬は、1  $\mu\text{g/ml}$ 前後で薬剤の濃度依存的に培養

Table 2. *L. pneumophila* のEM, CPFX, everninomicinに対する薬剤感受性

Strains <sup>a</sup>	serogroup	Erythromycin		Ciprofloxacin		Everninomicin	
		MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MBC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MBC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MBC ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>L. pneumophila</i>	1	0.25	8	0.032	0.032	0.016	0.5
<i>L. pneumophila</i>	2	0.25	1	0.016	0.064	0.016	0.5
<i>L. pneumophila</i>	3	0.125	16	0.016	0.016	0.008	0.5
<i>L. pneumophila</i>	4	0.25	1	0.032	0.032	0.016	0.25
<i>L. pneumophila</i>	5	0.25	32	0.016	0.032	0.016	0.5
<i>L. pneumophila</i>	6	0.5	1	0.032	0.032	0.064	0.5

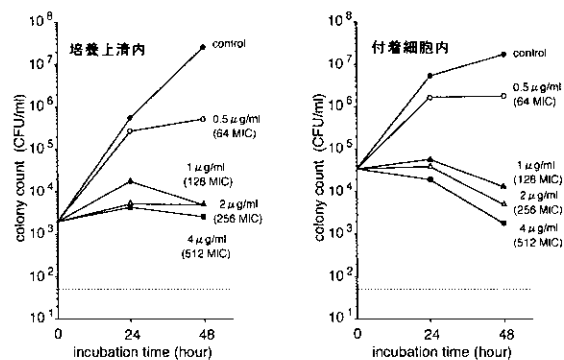
<sup>a</sup> *L. pneumophila* serogroup 1 is a type strain and others are reference strains.

Table 3. *Legionella* 属菌のEM, CPFX, everninomicinに対する薬剤感受性

Strains <sup>a</sup>	Erythromycin		Ciprofloxacin		Everninomicin	
	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MBC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MBC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MBC ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>L. micdadei</i>	2	32	0.004	0.008	0.016	1
<i>L. dumoffii</i>	2	16	0.032	0.032	0.25	1
<i>L. gormanii</i>	0.25	32	0.016	0.016	0.5	1
<i>L. jordanis</i>	2	32	0.016	0.016	0.016	0.5
<i>L. bozemanii</i>	1	8	0.008	0.016	0.032	0.032

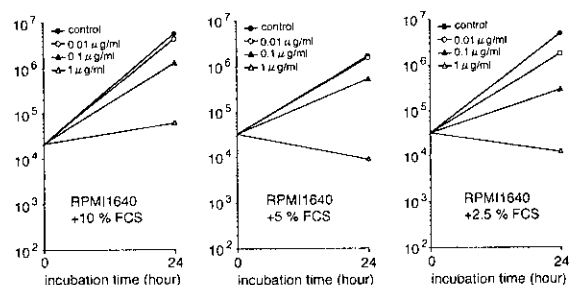
<sup>a</sup> All strains are type strains.


FIG. 5 everninomicinの*L. pneumophila*に対する細胞内増殖抑制効果



上清内及び付着細胞内の生菌数の増加を抑制した。この濃度は、マクロライド薬やニューキノロン薬の場合と違ってMICよりもかなり高い値であった。このため、培養液に添加するFCSの濃度のエバニノマイシンの抗菌効果に及ぼす影響を検討したが(FIG. 6)、本モデルにおいては、特に大きな影響が認められなかった。本薬の生体内での薬物動態、抗菌活性などは、未だ不明な点が多いが、本モデルにおいては、生体内でも十分に到達し得る濃度で、*L. pneumophila*に対する細胞内増殖抑制効果を認め、本薬が臨床的にも*Legionella*症に対して有効な薬剤のひとつである可能性が示唆された。


FIG. 6 everninomicinの*L. pneumophila*に対する細胞内増殖抑制効果におけるFCS濃度の影響






## 考 察

本研究では、ヒト単球由来細胞細胞株であるTHP-1を使って、in vitroの*L. pneumophila* 感染実験モデルを作製し、各種抗菌薬の細胞内増殖抑制効果を検討した。前述の様に*L. pneumophila* は細胞の食胞内で増殖可能な細菌で、本菌による肺炎は、気道末梢の肺胞マクロファージ等の細胞の中で、菌が増殖することによって起こり、その細胞内増殖性が*L. pneumophila* の病原性の本質であるとも言える<sup>1)</sup>。したがって、抗菌薬の治療効果を判定するためには、何らかの細胞の食胞内に寄生している*L. pneumophila* に対する効果を判定する必要があり、今までにも、ヒトの単球<sup>2, 3)</sup>、モルモットのマクロファージ<sup>4)</sup>、J774.1<sup>5)</sup>やHL-60<sup>6)</sup>などのcell lineの細胞を使用した報告が散見される。しかし、我々の調べうるかぎりTHP-1を使って抗菌薬の評価を試みた報告は未だ無い。このような実験にTHP-1を使用する意義としては、①ヒトの単球由来の細胞なので、より現実の治療に近いシミュレーションが可能である ② cell line化しているので供給が安定しており、一度に多くの検討も可能である。③ ヒトや動物の体から細胞を取り出して使うよりも操作が簡便で、しかも経済効率もよい ④ヒトや動物の体から細胞を取り出して使った場合、不可避と考えられる個体差による実験結果の変動が無く、優れた再現性を示すなどが考えられる。一方、様々なcell lineの細胞を使った研究は、①cell lineそれぞれの固有の特徴によると考えられる結果の差がある ②cell line化した細胞は、条件によっては細胞自体が増殖する ③同じcell lineでもPMA刺激の有無、感染比率、などの条件により結果に差がみられる などの問題点もある。いずれにしても、より現実の*Legionella* 症の治療に近いモデルを作成することは有意義であると考えられる。また、本モデルは*Legionella*属菌の細胞内増殖性(病原性)<sup>1)</sup>、サイトカイン誘導能をはじめとする生体の免疫系との関わりに関する研究<sup>7)</sup>などにも応用可能であると考えられ、さらに検討を加える予定である。



## 結 論


本研究で示された、ヒト単球由来細胞株THP-1を用いたin vitro *L. pneumophila*感染実験モデルは、各種抗菌薬の*L. pneumophila*に対する細胞内増殖抑制効果を評価するにあたって非常に有用な方法である。



## 発 表

学会：

1. Takemura H, Yamamoto H, Ikejima H, et al: Evaluation of activity of antimicrobial agents for *Legionella pneumophila* multiplying within human monocyte-derived cell line THP-1. 8th International congress on infectious diseases (Boston, USA), May, 1998.
2. Takemura H, Ikejima H, Kunishima H, et al: Evaluation of antimicrobial activities of SCH 27899 (everninomicin) for *Legionella* spp. 38th. Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy (San Diego, USA), September, 1998.
3. 竹村 弘、池島秀明、國島広之、他：ヒト単球由来細胞株THP-1を用いた各種抗菌薬の*L. pneumophila* に対する細胞内増殖抑制効果の検討。第72回感染症学会総会(大阪), 1998年4月



## 文 献

- 1) Horwitz M, Silverstein S: Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. J clin Invest 1980;66:441-450.
- 2) Havlicec D, Saravolatz L, Pohlod D: Effect of quinolones and other antimicrobial agents on cell-associated *Legionella*



- pneumophila*. Antimicrob Agents Chemother 1987;31:1529-1534.
- 3) Saito A, Sawatari K, Fukuda Y, et al: Susceptibility of *Legionella pneumophila* to ofloxacin in vitro and in experimental *Legionella* pneumonia in guinea pigs. Antimicrob Agents Chemother 1985;28:15-20.
- 4) Koide M, Miyara T, Higa F, et al: In vitro and in vivo evaluation of the antimicrobial activity of azithromycin against *Legionella* species. J Infect Chemother 1997;3:90-96.
- 5) Higa F, Kusano N, Tateyama M, et al: Simplified quantitative assay system for measuring activities of drugs against intracellular *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol 1998;36:1392-1398.
- 6) Stout JE, Arnold B, Yu VL: Activity of azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, dirithromycin, quinupristin/dalfopristin and erythromycin against *Legionella* species by intracellular susceptibility testing in HL-60 cells. J Antimicrob Chemother 1998; 41:289-291.
- 7) Blanchard D, Deju J, Klein T et al: Induction of tumor necrosis factor by *Legionella pneumophila*. Infect Immun. 1987;55:90-96.

# *Legionella pneumophila* による 肺炎の動物モデルとしてのマウス

## 分担研究者：

国立感染症研究所 細菌部

渡辺 治雄

## 研究協力者：

国立感染症研究所 細菌部  
同安全性研究部

倉 文明、前川純子  
後藤紀久

Mouse model of pneumonia due to *Legionella pneumophila*

Haruo Watanabe<sup>1)</sup>, Fumiaki Kura<sup>1)</sup>, Norihisa Goto<sup>2)</sup>, Junko Amemura-Maekawa<sup>1)</sup>

Department of Bacteriology<sup>1)</sup> and Department of Safety Research on Biologics<sup>2)</sup>,  
National Institute of Infectious Diseases

## 研究要旨

マクロファージ (Mφ) の貪食腔で増殖する *Legionella pneumophila* による肺炎の研究は、これまでモルモットの系でなされてきたが、マウスではうまく肺における菌の増殖が観察できなかった。今回、C57BL/6マウスを遺伝的背景とするgp91<sup>pho</sup>KOマウスを、Mφで *L. pneumophila* が増殖可能 (*LgnI*<sup>+</sup>) なA/Jマウスと交配することにより、Mφで *L. pneumophila* が増殖でき、かつ食細胞がスーパーオキシドを産生できない免疫不全マウスを作製した。このマウスを用いることにより、マウスでも *L. pneumophila* による顕著な肺炎を認めた。このマウスは今後診断と治療の研究に有用である。



## 目 的

これまで、マクロファージ (M $\phi$ ) の貪食腔で増殖する *Legionella pneumophila* による肺炎の研究はモルモットの系でなされてきたが、マウスではうまく肺における菌の増殖が観察できなかった。これは、モルモットではマウスに比べてリンパ球の活性化がおこりにくいためであると考えられている<sup>1)</sup>。

我々は、マウスM $\phi$ 様細胞株J774のリポ多糖刺激により誘導される *L. pneumophila* 増殖抑制が、スーパーオキシダの産生によっていることを見いだしている<sup>2)</sup>。食細胞のスーパーオキシダ産生はNADPH oxidaseによっているが、この酵素のサブユニットであるgp91<sup>phox</sup>のKOマウスが最近作製され、ヒトの慢性肉芽腫症 (CGD) モデルマウスとなっている<sup>3)</sup>。一方、マウスM $\phi$ における *L. pneumophila* の増殖には13番目の染色体上にある自然抵抗性 (*Lgn1*) が関係している<sup>4)</sup>。A/Jマウスは感受性 (*Lgn1*<sup>s</sup>)、C57BL/6マウスは抵抗性 (*Lgn1*<sup>r</sup>)である。今回、マウスの交配により *Lgn1*<sup>s</sup>のgp91<sup>phox</sup> KOマウスを作製し、顕著な肺炎を認めたので報告する。



## 材料と方法

菌株：*L. pneumophila* 血清群1長崎80-045株 (臨床分離株) を使用した。-80℃でスキムミルク中に凍結保存していた菌をBCYE寒天培地に接種して30℃で4日湿潤培養したものをかきとって生理食塩水に懸濁し、マクファーランドで菌数をあわせ、CFUとして生菌数を確認した。

マウス：129マウス由来ES細胞 (gp91<sup>phox</sup>に挿入変異を持つ) を注入されたC57BL/6マウス胚盤胞に由来するマウスの子孫から、gp91<sup>phox</sup>+/-の♀マウスが選択された。このキャリアー♀マウスをC57BL/6♂マウスに10回戻し交配して得られたキャリアー♀マウスを米国のDinauer MC博士より入手した。当施設の動物管理区でそのマウスを♂のA/Jマウスと戻し交配する事により *Lgn1*<sup>s</sup>のgp91<sup>phox</sup>KOマウ

ス (CGDと表記) が作製された。マウスの選択は、NBTスライドテストと腹腔M $\phi$ における *L. pneumophila* の増殖の有無によった。gp91<sup>phox</sup>はX染色体上にあるので、♂マウスにはキャリアーはない。感染実験には2-5月齢の♂マウスを用いた。

M $\phi$ ：チオグリコレート培地をマウス腹腔に2ml投与後、4日目の腹腔滲出細胞をプラスチックの培養基底に付着させて用いた。

スーパーオキシダの検出：M $\phi$ の培養にTPAあるいはザイモサンを添加し、ルシゲニンによる化学発光で検出した。また、NBTスライドテストにより抹消血由来の好中球からのTPA刺激によるスーパーオキシダの産生をホルマザンの沈殿として検出した。

M $\phi$ 感染実験：24穴プレートに5x10<sup>6</sup>の腹腔M $\phi$ を付着させ、M $\phi$ あたり1個の *L. pneumophila* を感染させ、2日後の生菌数を測定した。培養液は、牛胎児血清を10%添加した抗生物質不含のRPMI1640培地を用いた。

マウス感染実験：生理食塩水に懸濁した3x10<sup>6</sup>の *L. pneumophila* を気管内接種法等で20 $\mu$ lマウスに投与した。経日的にマウスを解剖して肺、肝臓、脾臓を無菌的に取り出し、ストマッカーあるいは乳鉢で臓器をすりつぶした後に生理食塩水で希釈し、BCYE寒天プレートにまいて臓器中のCFUを求めた。肺を中性ホルマリン固定の後、パラフィン包埋してH-E染し肺の病変を観察した。



## 結 果

### 1. M $\phi$ の性状

NADPH oxidaseは、膜に結合したサブユニットと細胞質にあるサブユニットがある。gp91<sup>phox</sup>KOマウスでは膜にある91kDの糖タンパクが発現していない<sup>3)</sup>。腹腔M $\phi$ はインターフェロン、リポ多糖で20時間前処理するしないに関わらずTPA刺激によってスーパーオキシダを産生できなかった。また、C57BL/6を遺伝的背景とするマウス (*Lgn1*<sup>r</sup>) 由来M $\phi$ では、たとえスーパーオキシダを産生できなくても *L. pneumophila* は増殖できなかった (データ示していない)。

2. 生存曲線

$10^7$ の投与量でも野生型マウスは生き残ったが、同じ量でgp91<sup>phox</sup>のKOマウス (CGD) は全例死亡、 $3 \times 10^6$ の量でも2割しか生き残らなかった (図1)。LD50は、約1/30に低下した。

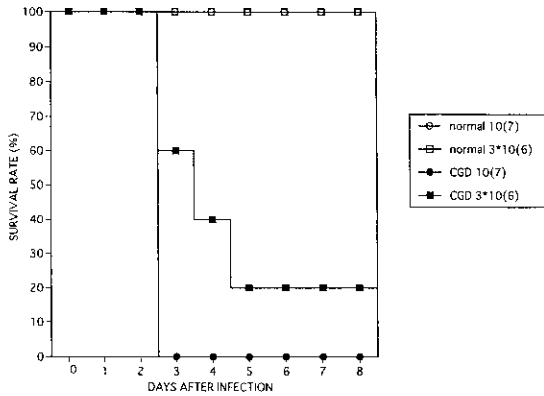


図1. *L. pneumophila* 感染後のマウス生存曲線

3. 臓器中の生菌数

菌を経口気管内接種法によりLgn1s, gp91<sup>phox</sup>/マウスおよびLgn1s, gp91<sup>phox+</sup>/に投与するとスーパーオキシドを産生できないCGDマウス (黒塗り記号) では、2日をピークとする肺における菌の増加をはじめ、肝臓や脾臓でも菌が増加した。Lgn1<sup>s</sup>, gp91<sup>phox+</sup>マウス (白抜き記号) は肺で菌が増えず、肝臓や脾臓の菌も1日目に検出されたのみだった。2日目の両マウス間の菌量の差はどの臓器でも1000倍であった (図2)。感染2日以降は、肺で菌が減少していることから、感染初期に強いスーパーオキシド産生活性を持つ好中球の働きがレジオネラ肺炎の防御に重要であると考えられた。

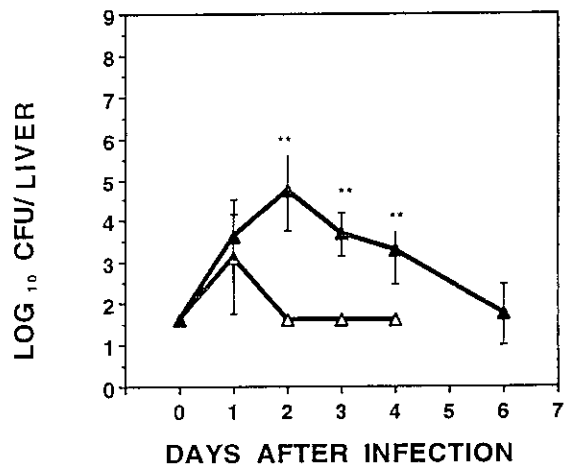
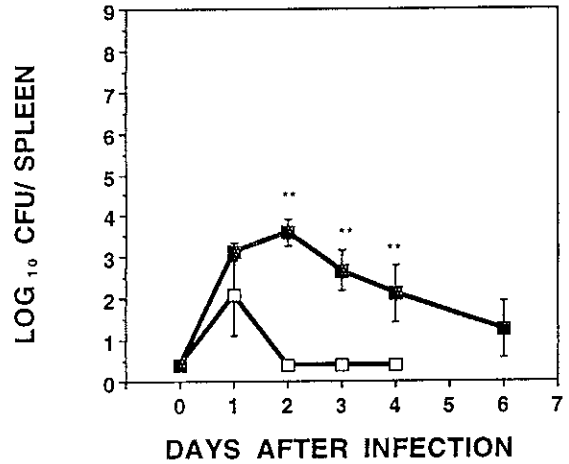
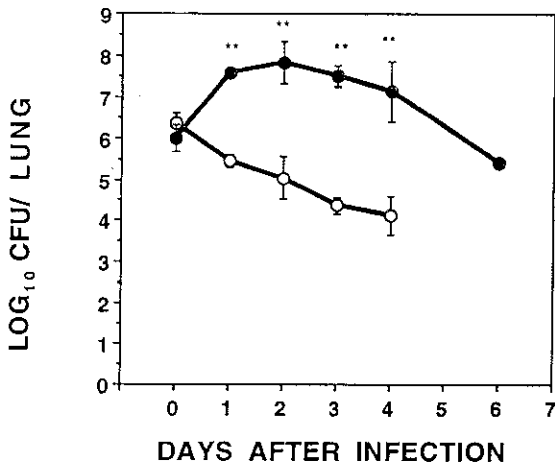
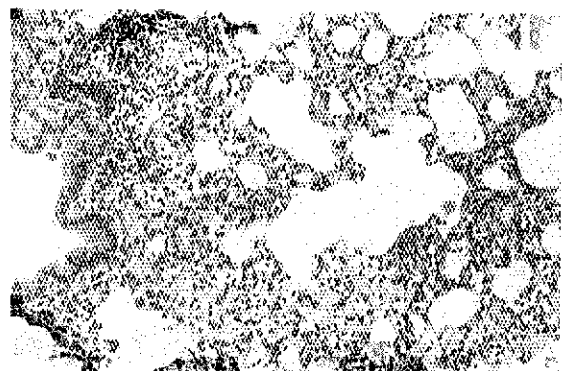


図2. *L. pneumophila* 感染後のマウス臓器における生菌数タイムコース

(●■▲;CGD、○□△;NORMAL)

4. 肺炎像

gp91<sup>phox+</sup>/マウスの肺では、肺胞には白血球がほとんど認められず、胞隔炎が見られたのみだが、Lgn1<sup>s</sup>gp91<sup>phox</sup>-マウス (CGD) では、4日後の肺胞内に多数の多形核白血球や浸出液が認められる混合型肺炎であった (図3)。*L. pneumophila* SG1 に対する抗体により免疫染色すると、Mφや多形核白



DAY 4 NORMAL