

目的：

レジオネラ属を対象とした薬剤感受性検査法は、これまでに寒天平板法などを用いた報告が散見されるものの操作は煩雑であり¹⁾²⁾、また臨床検体から本菌が分離される頻度は他の一般細菌に比べて低いため日常検査として薬剤感受性検査を行うことは困難と思われる。そこで今回我々は簡便に施行でき、栄養要求性や培養条件の厳しい菌種に対しても有用性が高いとされているE testでレジオネラ属を対象にMIC測定を試みるとともに寒天平板希釈法との比較検討を行った。

材料と方法：

対象菌種：レジオネラ属の臨床由来株 - 23株を対象とした。その内訳は *Legionella pneumophila* - 21株、*L. micdadei* - 1株、*L. longbeachae* - 1株であり、さらにレジオネラ属のATCC株 - 3株 (*L. pneumophila* serogroup1 - ATCC 33152、*L. bozemanii* serogroup1 - ATCC 33217、*L. gormanii* - ATCC 33297) をコントロールとして用いた。また *Staphylococcus aureus* - ATCC 29213株と *Escherichia coli* - ATCC 25922株を精度管理用として使用した。

使用薬剤：erythromycin (EM)、clarithromycin (CAM)、roxithromycin (RXM)、azithromycin (AZM)、rifampicin (RFP)、minocycline (MIN O)、levofloxacin (LVFX)、sparfloxacin (SPFX)、piperacillin (PIPC)、ceftazidime (CAZ)、imipenem (IPM)、gentamicin (GM) の以上12薬剤を対象とした。

使用培地：レジオネラ属の前培養および薬剤感受性用としてLEGIONELLA AGAR BASE (DIFCO) にL-Cysteine Hydrochloride Monohydrate (和光純薬) とIron (Ⅲ) Pyrophosphate, Soluble (和光純薬) を加えたbuffered charcoal yeast extract agar (BCYE α) を用い、精度管理と基礎培地の検討用としてMueller-Hinton agar (DIFCO) を使用

した。なお、Etestで使用する培地については、中心部の厚さが 4.0 ± 0.5 mmになるよう作製し、今回は直径150mmの大型シャーレ (FALCON) を用いた³⁾。

E test (AB BIODISK、アスカ純薬 (株)) : BCYE α 培地で48時間前培養後、Etest technical guide に従い、生理食塩水にMcFarland 0.5となるように菌液を調製した。15分以内にディスク法の要領で滅菌綿棒にて3方向からBCYE α 培地に塗抹し、菌液が浸透後E test[®] のストリップを配置した。36℃、5%CO₂ の条件下で、判定は48、72、96時間後に行った。判定は培地上に形成された阻止帯がストリップと交差した位置の目盛をMIC値として目視判読した³⁾ (Fig.1)。

寒天平板希釈法：E testと同様に前培養後、NCCLS に準じ各薬剤の薬液を調製後、薬剤加BCYE α を作製し生理食塩水でMcFarland 0.5に調製した菌液をマイクロプランターにて 10^4 CFU/spotとなるように接種した⁴⁾。培養条件と判定時間はE testと同様に行った。



Fig.1 *L. pneumophila* のE testによる薬剤感受性結果 (RFP)

結果：

基礎培地の種類によるMIC値の変化：*S.aureus* と *E. coli* の標準菌株を用いてMueller-Hinton培地 (MH) とBCYE α 培地でのMIC値の変化を検討してみると、全薬剤でMH培地よりBCYE α 培地を用いた方が高いMIC値を示した (Fig.2)。 *S.aureus* では平均2.8管、*E.coli* では平均1.9管程高値を示した。

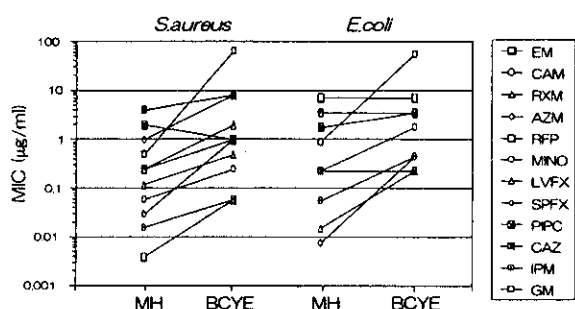


Fig.2 *S.aureus*および*E.coli*の標準株を用いた基礎培地のMIC値に与える影響の検討

薬剤別にみると2菌種ともにGMとSPFXの差が大きく、5~7管の差が認められた。

判定時間によるMIC値の変化：多くの薬剤でMIC値の経時的な変化はわずかであった。しかし、IPMでは寒天平板法でMIC値が上昇したのに対しE testでは変化がみられず、PIPCとSPFXでは寒天平板法でMIC値が変わらず、E testで上昇がみられた。またMINOについては寒天平板法、E testともにMIC値の上昇が認められ、特に寒天平板法では48時間後と96時間後で全株2管以上の上昇がみられた (Fig. 3)。

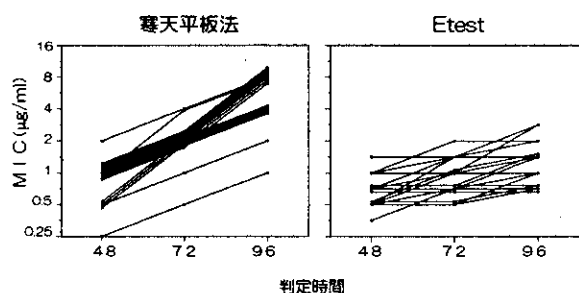


Fig.3 E testおよび寒天平板法の判定時間によるMIC値の変動 (MINO)

E testと寒天平板希釈法のMIC値の相関：Etestと寒天平板法の相関を示した (Table.1)。相関係数のみから判断すると相関係数が0.6以下の低い相関しか認めない薬剤もあった。これらを分布図に表してみると、高い相関係数を示した薬剤は値が比較的広く分散しているが (Fig.4)、低い相関係数を示した薬剤は値が分散せず一部に集中していた (Fig. 5)。

E testと寒天平板希釈法によるMIC値の比較：各薬剤のMIC50、MIC90は全体的にE testが寒天平板

法に比べて低い値を示した (Table.2)。RFPは12薬剤中最も高い抗菌活性を示し、MINOはレジオネラ感染症時に使用される薬剤の中では比較的高いMIC値を示した。

Table.1 E testおよび寒天平板法のMIC値の相関

EM	0.455*	LVFX	-0.027
CAM	0.249	SPFX	0.451*
RXM	0.725*	PIPC	0.944*
AZM	0.709*	CAZ	0.803*
RFP	0.363	IPM	0.309
MINO	0.411	GM	-0.382

*：相関あり

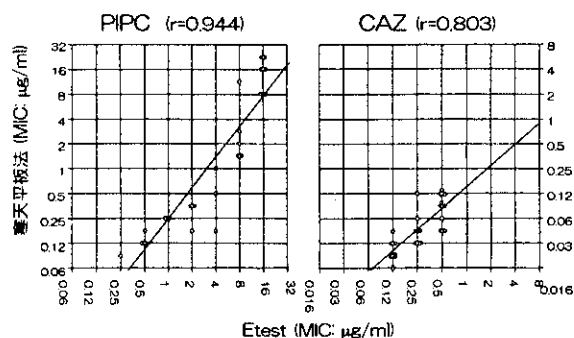


Fig. 4 E testおよび寒天平板法のMIC値の相関 (PIPC, CAZ)

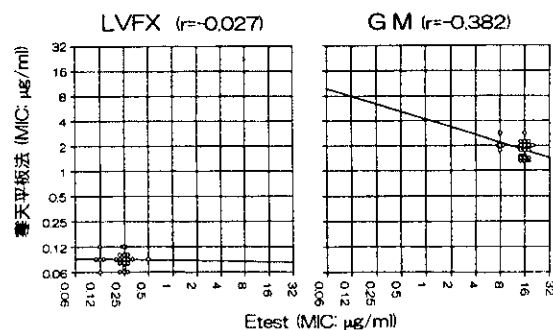
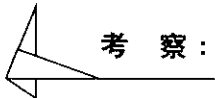


Fig. 5 E testおよび寒天平板法のMIC値の相関 (LVFX, GM)

Table 2 E test および寒天平板法によるMIC50, MIC90の比較

	M I C 50		M I C 90	
	寒天平板	Etest	寒天平板	Etest
EM	1	00.125	2	0.38
CAM	0.12	0.047	0.12	0.064
RXM	0.25	0.047	0.5	0.125
AZM	0.25	0.064	2	0.5
RFP	0016	0.008	0.016	0.012
MINO	2	1	2	1.5
LVFX	0.25	0.094	0.25	0.125
SPFX	0.25	0.094	0.5	0.125
PIPC	4	1	16	16
CAZ	0.25	0.047	0.5	0.125
IPM	0.25	0.047	1	0.064
GM	16	2	16	2



考 察 :

手技的な観点からみるとレジオネラの場合は他の一般細菌に比べて発育が緩慢な為に、E testの場合、早い時間では阻止帯が不明瞭であり48時間後より72時間後の判定の方が望ましいと考えられた。判定には多少の熟練が必要と思われたが、操作は所要時間も少なく簡便であった。一方、寒天平板法では48時間後の早期の判定でも充分判読可能であり、判定はE testよりも容易であった。しかし操作が煩雑でかなりの時間を要し、日常検査として行うのは不向きであると思われた。

基礎培地の違いによるMIC値の検討では、全薬剤においてMH培地よりBCYE α 培地が高い値を示した。その理由としてはBCYE α 培地に含まれる活性炭などの影響などが示唆された。

判定時間によりMIC値が変動する理由としては、例えばIPMは室温下で不安定なために薬剤の力価が低下した可能性が高いものと考えられた。またMINOでは静菌的に作用するために早期の菌の増殖が抑制され、見かけ上MIC値が高く出たものと思われた。Rhombergらの報告でもdoxycyclinが他の薬剤に比べてMIC値が高いことが述べられている⁹⁾。このように判定時間によりMIC値が変化することはレ

ジオネラの薬剤感受性を検査するにあたって注意すべき点と考えられた。

E testと寒天平板法の相関は相関係数のみから判断すると、高い相関係数を示した薬剤は値が比較的広範囲に分散しているために高い相関係数が得られたものと思われた。一方、低い相関係数を示した薬剤は値が分散せずに一部分に集中していることが相関係数を低くさせた原因だと考えられた。しかし2つの方法のMIC値を比較すると、かなり類似した値を示しているのでEtestも寒天平板法に劣らない検査法であると思われた。

全体的にE testは寒天平板法に比べて低いMIC値を示した。この傾向は外国の文献^{5) 6)}でも報告されているがその理由は明らかになっていない。2つの方法間においてIPMで3管程度の最も大きい差がみられたが、他の薬剤は全体としては平均1~2管程度の差であった。今回検討した薬剤の中でレジオネラ感染症時に投与される薬剤において耐性株は認められなかった。RFPは12薬剤中最も良い抗菌活性を認め、Marquesらの報告にも同様の結果が記されている^{5) 6)}。



結 論 :

E testは手技が簡便であり、従来の測定法に比べて遜色ない結果が得られたことから、レジオネラ属の薬剤感受性検査において有用性が高い検査法と考えられた。



文 献 :

- 1) Ristroph JD, Hedlund KW, Allen RG : Liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol 11:19-21, 1980
- 2) Edelstein PH, Meyer RD : Susceptibility of *Legionella pneumophila* to twenty antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 18: 403-408, 1980
- 3) AB BIODISK : E test technical guide 1-13.

- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighth informational supplement. NCCLS Document M100-S8 18, 1998
- 5) Marques T, Piedade J :Susceptibility testing by E test and agar dilution of 30 strains of *Legionella* spp. isolated in Portugal. Clin Microbiol Infect 3:365-368, 1997
- 6) Rhomberg PR, Bale MJ, Jones RN :Application of the Etest to antimicrobial susceptibility testing of *Legionella* spp. Diag Microbiol Infect Dis 19:175-178, 1994

Legionella pneumophila の細胞内増殖性および 各種抗菌薬の細胞内増殖抑制効果に関する検討

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

Evaluation of human monocytic cell line THP-1 and alveolar epithelial cell line A549 model for the intracellular activities of antimicrobial agents against *Legionella pneumophila*

Jingoro Shimada, Hiromu Takemura, and Hiroyuki Yamamoto

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 を用いた *L. pneumophila* に対する細胞内増殖抑制効果の検討に関して昨年・一昨年の本研究班で報告したが、今回はヒト肺胞上皮細胞である A549 を用いて同様の検討を試みた。THP-1 及び A549 に *L. pneumophila* を感染させ、細胞の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。抗菌薬非存在下では A549 の細胞内の生菌数は、感染直後は 1×10^4 CFU/ml 程度で、24 時間後には、 $1 \times 10^8 \sim 10^9$ CFU/ml 程度に増加し、顕微鏡による観察でも、アクリジンオレンジ染色で細胞内で増殖する本菌を観察し得た。今回は、THP-1 細胞に関しては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 10% 以下となる最小の濃度を MIEC (minimum extracellular concentration inhibiting intracellular multiplication) として抗菌薬の *L. pneumophila* の細胞内増殖抑制効果を評価した。MIEC と BYE- α 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 RFP、MINO、マクロライド薬である EM、CAM、AZM、ニューキノロン薬である CPFXX、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 β -lactam 薬の、ABPC、CTM、IPM の MIEC は、 $>64 \mu\text{g/ml}$ であった。また、A549 では、24 時間後で約 10 倍程度にしか菌数の増加が認められないため、48 時間後の生菌数が培養直後の生菌数よりも少なくなる最小の濃度を MIEC としたところ、CPFXX、MINO では、2 種類の細胞ではほぼ同等の MIEC を示したが、CAM、EM では、明らかに A549 の方が良好な MIEC を示し、RFP では逆に THP-1 の方が良好な MIEC を示した。これらの結果より、*L. pneumophila* の細胞内増殖抑制効果は薬剤のみではなく細胞の種類によって相違があることが示唆された。

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¹⁾。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⁾。また、*Legionella* 菌は、肺胞マクロファージのみではなく、肺胞上皮細胞においても増殖できることが報告されている⁷⁾。我々は、昨年・一昨年の本研究の報告で、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。そこで今回は、ヒト単球由来細胞株である THP-1 に加えて、ヒト肺胞上皮細胞である A549 を用いて抗菌薬の *L. pneumophila* に対する細胞内増殖抑制効果における細胞による相違を中心にさらに検討を加えて報告する。

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, SMUM-877 で、細胞は、ヒト単球由来細胞株である THP-1 (JCRB 0112.1)、ヒト II 型肺胞上皮細胞株である A549 (JCRB0076) である。使用した抗菌薬は、aminobenzyl penicillin (ABPC), cefotiam (CTM), imipenem (IPM), erythromycin (EM), clarithromycin (CAM), azithromycin (AZM), ciprofloxacin (CPFX), grepafloxacin (GPFX), clindamycin (CLDM), rifampicin (RFP), minocycline (MINO) である。抗菌薬の *L. pneumophila* に対する MIC は、BYE- α 液体培地を用いた微量液体希釈法で測定した。THP-1 は 10% FCS 添加 RPMI 1640 液体培地にて 1×10^6 /ml に調整し、37°C、5% CO₂ 条

件下で、24 時間、16nM 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させた細胞を使用した。A549 は 2×10^6 /ml に調整し、37°C、5% CO₂ 条件下で、24 時間培養し monolayer になったものを使用した。これらの細胞に、THP-1 は 5×10^4 CFU/ml、A549 は 5×10^6 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°C、5% CO₂ 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、培養上清を取り除き、培養上清と等量 (500 μ 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。また、A549 における *L. pneumophila* の細胞内増殖を確認する目的で、上述の培養系で得た *L. pneumophila* 感染 A549 細胞をアクリジンオレンジ染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

結果

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

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% ウシ胎児血清添加 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図 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、

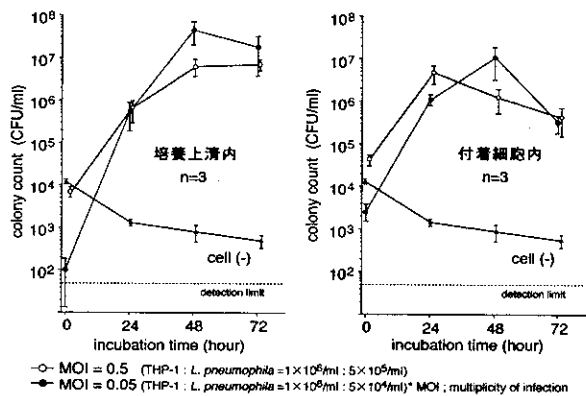


FIG.1 THP-1 細胞における*L.pneumophila* (SMUM-353) の細胞内増殖

付着細胞内では、培養開始直後は、 2×10^5 CFU/ml程度であったが、24時間培養後には 1×10^6 CFU/ml、48時間後には 1×10^6 CFU/ml程度に増加し、72時間後には、むしろ 3×10^5 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、 1×10^6 CFU/ml程度であるが、その後、付着細胞内と同様の経時的変化を示し、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、 1×10^7 CFU/ml程度の生菌数であった。

2. THP-1細胞における各種抗菌薬の*L. pneumophila*の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、抗菌薬の効果は抗菌薬存在下で培養したときの生菌数を経時的に計測することで評価した。図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。図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。臨床的に有効であ

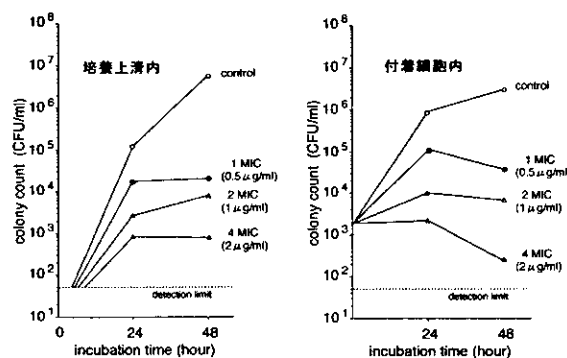


FIG.2 EMの*L.pneumophila* (SMUM-353) に対する細胞内増殖抑制効果

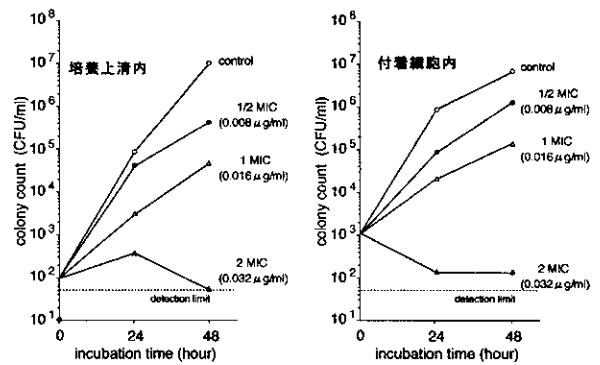


FIG.3 CPFxの*L.pneumophila* (SMUM-353) に対する細胞内増殖抑制効果

る代表的な4薬剤に関して、*L. pneumophila* の細胞内増殖抑制効果を、経時的にコントロールとの比率で示した(表1)。細胞中、培養上清中およびそ

Table 1. 各種抗菌薬の*L.pneumophila* (SMUM-353) に対する細胞内増殖抑制効果^{a)}

Agent	concentration (μg/ml)	extracellular		intracellular		total	
		24 hour	48 hour	24 hour	48 hour	24 hour	48 hour
Erythromycin (n=4) (MIC: 0.5 μg/ml)	2	0.2 ± 0.3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	1	0.8 ± 0.9	0.1 ± 0.2	0.4 ± 0.4	0.3 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.2 ± 0.4
	0.5	6.1 ± 5.6	0.5 ± 0.7	4.3 ± 5.7	1.7 ± 2.3	4.5 ± 5.1	1.3 ± 2.0
	0.25	12.3 ± 1.7	9.9 ± 6.6	21.0 ± 10.1	12.5 ± 5.5	16.7 ± 5.7	11.2 ± 5.8
Ciprofloxacin (n=3) (MIC: 0.016 μg/ml)	0.032	<0.1	<0.1	0.1 ± 0.3	<0.1	<0.1	<0.1
	0.016	2.2 ± 1.9	0.6 ± 0.9	2.1 ± 1.7	0.2 ± 0.3	2.2 ± 1.8	0.3 ± 0.6
	0.008	42.2 ± 12.4	16.8 ± 16.4	31.7 ± 17.3	2.4 ± 1.9	37.0 ± 14.8	6.5 ± 4.9
Rifampicin (n=3) (MIC: 0.0025 μg/ml)	0.004	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	0.002	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	0.001	32.3 ± 20.9	3.1 ± 1.3	19.3 ± 6.0	1.0 ± 1.4	26.9 ± 14.3	1.4 ± 1.3
Minocycline (n=3) (MIC: 7 μg/ml)	0.125	0.2 ± 0.2	<0.1	0.6 ± 0.2	<0.1	0.3 ± 0.2	<0.1
	0.063	23.5 ± 9.6	46.3 ± 27.7	37.1 ± 16.1	9.9 ± 7.1	26.4 ± 9.3	18.9 ± 14.3

a) Data are expressed by the inhibition ratio (colony counts of *L. pneumophila* with agent/ that without agent × 100%), and values represent the mean ± SD of three or four independent experiments.

の和である総菌数に分けて検討したが、4薬剤ともにすべての項目で濃度依存的・経時的に生菌数が減少した。また、24時間の判定でコントロールの10%以下となる薬剤濃度では、48時間後の生菌数はコントロールと比べてさらに減少し1%前後であることがわかる。この結果をふまえて、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10%以下となる最小の濃度をMIEC (minimum extracellular concentration inhibiting intracellular multiplication) とする Vildéらの評価法に従って抗菌薬の*L. pneumophila* の細胞内増殖抑制効果の評価を試みた(表2)。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、MIECと微量液体希釈法によるMICは、ほぼ同等の値であったが、細胞内移行が特に良いとされているGPFx, CLDM, MINOはMIECがやや低い値を示した。一方、臨床的に*Legionella*症に無効とされているβ-lacta-

m 薬 (ABPC, CTM, IPM) は、MIC の値は0.25, 0.5, 0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と良好であったが、MIEC の値は $>64 \mu\text{g}/\text{ml}$ という結果であった。

Table2. THP-1を用いた各種抗菌薬の *L.pneumophila* (SMUM-353) に対するMIEC培養開始24時間後の計数で

培養上清内の生菌数+付着細胞内の生菌数 $\times 100 \leq 10\%$ になる最小の薬剤の濃度
drug (-) controlの生菌数

Agent	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIEC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIEC/MIC ratio
Aminobenzyl penicillin	0.25	>64	-
Cefotiam	0.5	>64	-
Imipenem	0.032	>64	-
Erythromycin	0.5	0.5	1
Clarithromycin	0.032	0.032	1
Azithromycin	0.125	0.064	1/2
Clindamycin	16	2	1/8
Ciprofloxacin	0.016	0.016	1
Grepafloxacin	0.016	0.004	1/4
Minocycline	1	0.125	1/8
Rifampicin	0.00025	0.002	8

3. A549細胞における *L. pneumophila* の細胞内増殖

一方、ヒトのII型肺胞上皮細胞株であるA549に同様の方法で *L. pneumophila* を感染させると、図4に示すような増殖曲線を示した。THP-1の場合と比較すると増殖は緩やかで、培養開始24時間後で生菌数が $1 \times 10^4 \text{CFU}/\text{ml}$ 程度になるように条件を

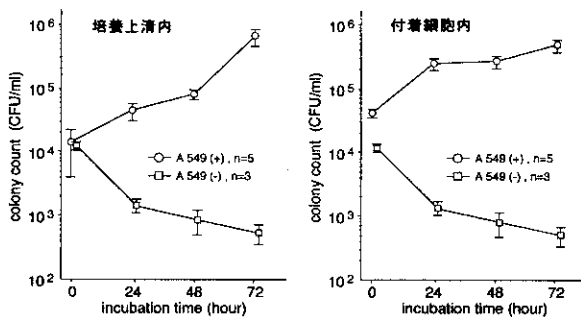


FIG.4 A549 細胞における *L.pneumophila* (SMUM-877) の細胞内増殖

設定すると、培養開始24時間後で生菌数が約10倍程度に増殖するが、その後72時間まで緩やかに増殖した。菌の培養上清および付着細胞内での増殖を確認するために、アクリジンオレンジ染色法を用いて細胞を顕微鏡で観察した。写真1は培養開始24時間後の付着細胞で、細胞の中に集簇した形で菌体が多数みられ、*L.pneumophila* が細胞内増殖した像と考えられた。一方、培養上清中(写真2)には集簇した菌体を多数伴った、壊れた細胞が多くみられた。これらの結果より、A549の場合もTHP-1の場合と

同様に、培養上清中の生菌数の増加は、菌の増殖により細胞が破壊されて、培養上清中に出てきた菌によるものであると考えられた。

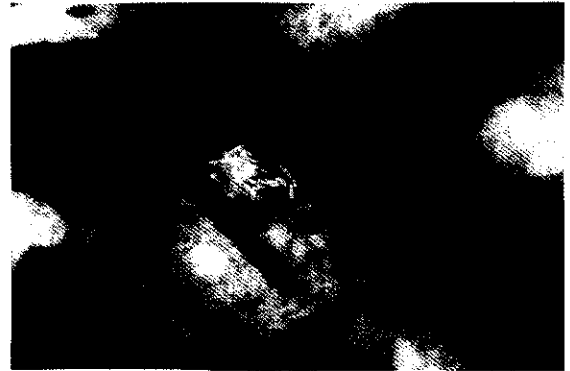


写真1



写真2

4. A549細胞における各種抗菌薬の *L.pneumophila* の細胞内増殖抑制効果

このA549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、生菌数を経時的に計測することによって評価した。図5にEMの場合の生菌数(総菌数)の経時変化を両細胞で比較したものを示した。図5aがTHP-1で図5bがA549を用いた場合で、A549ではより低濃度のEMで細胞内増殖を抑制した。そこで、この2種類の細胞における各種抗菌薬の細胞内増殖抑制効果の相違をMIECを用いて検討することを試みた。A549では、24時間後で約10倍程度にしか菌数の増加が認められないため、48時間後の生菌数が培養直後の生菌数よりも少なくなる最小の濃度をMIECとした。CPFX, MINOでは、2種類の細胞ではほぼ同等のMIECを示したが、CAM, EMでは、明らかに

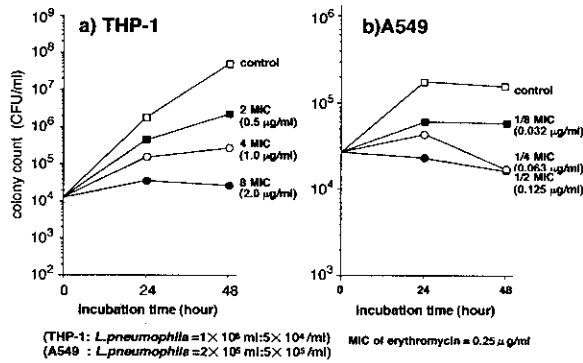


FIG.5 EMの*L.pneumophila* (SMUM-877) に対する細胞内抑制効果のTHP-1, A549細胞による比較

A549の方が良好な MIEC を示した。また RFP では逆にA549の方が高い MIEC を示し、薬剤によって相違があることが示唆された (表 3)。

Table3. 各種抗菌薬のMIECのTHP-1, A549細胞による比較

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	cell	MIEC ($\mu\text{g/ml}$)	MIEC / MIC ratio
clarithromycin	0.032	THP-1	0.032	1
		A 549	0.008	1/4
erythromycin	0.25	THP-1	1	4
		A 549	0.063	1/4
ciprofloxacin	0.016	THP-1	0.032	2
		A 549	0.063	4
minocycline	2	THP-1	0.125	1/16
		A 549	0.125	1/16
rifampicin	0.000125	THP-1	0.002	16
		A 549	0.008	64

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 (細胞内 MIC) を検討してきた。今回は、同様の手法を用いてヒト II 型肺胞上皮細胞である A549 を用いて各種抗菌薬の *L. pneumophila* に対する細胞内増殖抑制効果を検討し、THP-1 の場合と比較検討することを試みた。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や肺胞上皮細胞の中で、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^{1,7)}。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^{2, 3)}、モルモットのマクロファージ⁴⁾、J774.1⁵⁾ や HL-60⁶⁾ などの cell line の細胞を使用した報告が散見される。しかし、我々の調べるかぎり肺胞上皮細胞を使って抗菌薬の評価を試みた報告は未だ無い。最初に、A549細胞における *L. pneumophila* の細胞内増殖性を 1) 生菌数を計測する方法、2) アクリジンオレンジ染色した感染細胞の観察によって確認した。A549細胞の感染モデルでは、THP-1 の場合と比較して *L. pneumophila* の増殖性が緩やかで、培養開始直後の生菌数が 1×10^4 CFU/ml 程度になるようにしても、24時間後で生菌数が約10倍程度にしか増殖しなかったが、72時間後でも緩やかに増殖した。これは、1) 増殖性が緩やかなので、細胞の破壊が進行しないこと、2) A549は THP-1 と違って細胞自体が増殖することなどが原因と考えられる。増殖が緩やかな理由は、cell line それぞれの固有の特徴と考えられるが、A549がいわゆる貪食細胞ではないことより、細胞内での *L. pneumophila* を取り巻く環境の違いが大きいと思われる。このことは、今後の研究課題となり得ると考えられる。

昨年・一昨年の本研究の報告で、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) として抗菌薬の *L. pneumophila* に対する細胞内増殖抑制効果を評価した。しかし、今回のより詳細な検討で、24時間の判定でコントロールの10%以下となる薬剤濃度では、48時間後の生菌数はコントロールと比べてさらに減少し1%前後であることがわかった。そこで今回は、この結果をふまえて、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10%以下となる最小の濃度を MIEC (minimum extracellular concentration inhibiting intracellular multiplication) とする Vildé らの評価法に従って抗菌薬の *L. pneumophila* の細胞内増殖抑制効果を評価を試みた。抗菌薬の細胞内増殖抑制効果の両細胞間での相違を検討することが今回の研究主題であったが、A549では、24時間後で約10

倍程度にしか菌数の増加が認められないため、MIEC の定義をそのままにすると不都合であった。そこで、A549の場合は48時間後の生菌数が培養直後の生菌数よりも少なくなる最小の濃度を MIEC として細胞内増殖抑制効果を評価を試みたところ、薬剤の種類によって相違があることが示唆された。すなわち、CPFX、MINO では、2種類の細胞ではほぼ同等の MIEC を示したが、CAM、EM では、明らかに A549の方が良好な MIEC を示した。また RFP では逆に A549の方が高い MIEC を示した。臨床的には Legionella 症に対してマクロライド薬が第一選択薬とされることが多く、その成績も非常に良好であることを考え合わせると非常に興味深い結果と考えられる。

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、肺胞上皮細胞内での *L. pneumophila* の挙動や、抗菌薬の細胞内増殖抑制効果の両細胞間での相違などについて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。また、ヒトⅡ型肺胞上皮細胞である A549における同様の検討で、抗菌薬の *L. pneumophila* に対する細胞内増殖抑制効果は、細胞の種類によって相違があることが示唆された。



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回日本感染症学会総会（大阪）、1998年4月
4. 竹村 弘、池島秀明、國島広之、他：新規ニューキノロン薬CS-940の *Legionella pneumophila* に対する細胞内増殖抑制効果の検討。第47回日本化学療法学会総会（東京）、1999年6月
5. Kunishima H, Takemura H, Ikejima H, et al: Evaluation of activity of macrolides and other antimicrobial agents for *Legionella pneumophila* multiplying in human monocytic cell line THP-1 and alveolar epithelial cell line A549. 21st International Congress of Chemotherapy, Birmingham, UK
6. Takemura H, Ikejima H, Kunishima H, et al: Uptake and intracellular activity of SCH 27899 (everninomicin) in human monocytic cell line THP-1. 39th. Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy (San Francisco, USA), September, 1999



文 献

1. Horwitz M, Silverstein S: Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. J clin Invest 66:441-450, 1980
2. Havlicec D, Saravolatz L, Pohlod D: Effect of quinolones and other antimicrobial agents on cell-associated *Legionella pneumophila*. Antimicrob Agents Chemother 31:1529-1534, 1987
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 28:15-20, 1985
4. Koide M., T. Miyara, F. Higa, et al: In vitro and invivo evaluation of the antimicrobial activity of azithromycin against *Legionella* species. J Infect Chemother 3:90-96, 1997
 5. Higa F., N. Kusano, M. Tateyama, et al: Simplified quantitative assay system for measuring activities of drugs against intracellular *Legionella pneumophila*.. J Clin Microbiol 36: 1392-1398, 1998
 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 41:289-291, 1998
 7. Mody CH, Paine R, Shahrabadi MS, et al: *Legionella pneumophila* replicates within rat alveolar epithelial cells. J Infect Dis 167:1138-45, 1993

遺伝子・生理活性による *Legionella* 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、竹村 弘

Genetic and physiologic marker for detection of *Legionella* species

Jingoro Shimada, Hiroyuki Yamamoto and Hiromu Takemura

Department of Microbiology, Saint Marianna University School of Medicine

研究要旨

遺伝子や生理活性の検出および蛍光抗体による細菌の検出は、分離培養法だけでは明らかにできない生理・生態を観察できる方法である。環境に常在する *Legionella* 属細菌の動態を正確に把握するためには、分離培養に加えて遺伝子検出や種々の染色法による菌体検出が必要である。本研究では、このような検出法が *Legionella* 属細菌の検査や研究においてどのように利用できるかを検討した。その結果、検査において有用であることが示された。また、環境条件に対する細菌の生理を解析できることを認めた。

結言

環境の *Legionella* 属細菌の調査では、検査法により菌数や陽性判定の結果に違いが生じる。これは多くの細菌で観察されてきた viable but non-culturable cell (VNC or VBNC) 現象に起因する。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は、抗原検出、遺伝子検出、生理活性検出などの分離培養に依存しない方法が使われている。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* 属細菌の動態を正確に把握できる可能性がある。本報告では、細胞生理や VNC の研究などにおいて広く使われている様々な蛍光染色および遺伝子検出による *Legionella* 属細菌の検出方法を検討し、その有用性と問題点を考察した。

材料と方法

PCR法による遺伝子検出：試料は遠心分離（7,000～10,000g, 10～13分）により沈渣を集め、滅菌超純水に再懸濁し、再度遠心分離をして集めた沈渣の一部をTE緩衝液（10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA 2 Na, pH8.0）100 μ lに懸濁し、酵素（lysozyme, 0.1mg/ml; achromopeptidase, 10-100 U/ml）を添加して37℃で30分、55℃で30分反応させた。さらに酵素（proteinase K, 0.1mg/ml）を添加して55℃で30～60分反応させた後、98℃で5分間加熱して酵素を失活させた溶液をPCR用試料とした^{6,9,10}。プライマーは表1に示した LEG448と LEG854を使用し、98℃で15秒、61℃で1分、70℃で30秒のサイクルを40回繰返し、電気泳動により結果を判定した。

フィルター捕集法：水試料のろ過には、ポリカーボネート製の黒色フィルター（GTBP, 孔径0.2 μ m, Millipore）を使用した。フィルター上に捕集した蛍光染色菌体は、乾燥後に蛍光顕微鏡で観察した。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^{9,10}。

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 Cy 5 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 μ g/ml; DAPI) 水溶液により5分間の対比染色した。蛍光抗体染色用の試料は1-2%パラホルムアルデヒド（paraformaldehyde in PBS）により固定した⁹。

エステラーゼ活性：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¹⁰。

呼吸活性：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⁷。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, 2min）により回収し、沈渣を反応溶液（10 mM Tris-HCl; pH 7.2, 1mM EDTA 2Na; pH 8.0, 10 μ 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 μ 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；456nm）による青色蛍光と CTC-formazan の赤色粒子（励起波長；488nm、蛍光波長；602nm）が確認できた細胞を呼吸活性陽性とした。

DNA/RNA 識別染色：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した⁸。試料

(1 ml) を酸性溶液 (1.5ml; 80mM HCl, 150mM NaCl) と混合する。次に色素液 (6 ml; acridine orange 12 μg/ml in the buffer; 0.2M Na₂PO₄, 50mM citric acid, 1 mM EDTA 2 Na, 150mM 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; 490nm) は二本鎖 DNA と結合すると緑色蛍光 (530nm) を、一本鎖 RNA と結合すると橙色蛍光 (640nm) の蛍光を発する。蛍光色素標識 DNA プローブ染色: ここで使用した FISH 法 (Fluorescence in situ Hybridization) は、蛍光 DNA プローブを細菌細胞内でリボソーム上の rRNA 標的配列に結合させる方法である^{1, 3)}。

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') を使用した。試料はパラホルムアルデヒドで固定した後70%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 (0.9M NaCl, 0.01% SDS, 20mM 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℃の洗浄液 (20mM Tris-HCl [pH 7.6], 0.01% SDS, 5 mM EDTA, 160mM 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。スライドグラ

表1 レジオネラ検出・同定用の遺伝子塩基配列

Lmip L920	5' GCT ACA GAC AAG GAT AAG TTG 3'
Lmip R1548	5' GTT TTG TAT GAC TTT AAT TCA 3'
対象: <i>L. pneumophila</i> macrophage infectivity potentiator (mip) gene (4)	
反応条件; 96℃/15秒、50℃/1分、70℃/60秒	
PCR産物塩基数; 650bp	
L5S L9	5' ACT ATA GCG ATT TGG AAC CA 3'
L5S R93	5' GCG ATG ACC TAC TTT CGC AT 3'
対象: genus <i>Legionella</i> 5S ribosomal RNA (rRNA) gene (4)	
反応条件; 96℃/15秒、60℃/1分、70℃/30秒	
PCR産物塩基数; 104bp	
LEG 225A	5' AAG ATT AGC CTG CGT CCG AT 3'
LEG 448A	5' GAG GGT TGA TAG GTT AAG AGC 3'
LEG 854B	5' CGG TCA ACT TAT CGC GTT TGC T 3'
LEG 858B	5' GTC AAC TTA TCG CGT TTG CT 3'
対象: genus <i>Legionella</i> 16S rRNA gene (6, 9)	
反応条件; 96℃/15秒、61℃/1分、70℃/60秒	
PCR産物塩基数; LEG225A-854B (858B); 640bp	
LEG448A-854B (858B); 430bp	
DNAプローブ	
LEG 705B	5' CTG GTG TTC CTT CCG ATC 3'
LEGPNE1	5' ATC TGA CCG TCC CAG GTT 3'
対象:	
LEG 705B; genus <i>Legionella</i> 16S rRNA gene (5)	
LEGPNE1; <i>L. pneumophila</i> 16S rRNA (3)	

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。

細胞培養系でのモデル：ヒト単球由来細胞株である THP-1 (JCRB0112.1) を使用した。THP-1 は10% ウシ胎児血清添加 RPMI 1640 液体培地にて 1×10^6 cell/ml に調整し 37°C で 5% CO₂、24 時間培養後、16nM 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附着させた細胞を使用した。この細胞に、 5×10^4 CFU/ml の *L. pneumophila* を接種して10%ウシ胎児血清添加 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培養した。

表2 複数の検出方法による環境レジオネラ調査の結果

	水温 (°C)	水中の 総菌数 (cell/100ml)	<i>L.pneumophila</i> (蛍光抗体染色) (cell/100 ml)	レジオネラ コロニー数 (cfu/100 ml)	PCR法	
					LEG	LP
冷却塔水						
G-3	29.5	8.1×10^6	3.3×10^5	1.8×10^2	+	+
G-4	31.0	2.1×10^7	1.1×10^5	1.0×10^2	+	-
G-9	29.4	5.5×10^8	1.9×10^6	5.5×10^3	+	+
G-13	28.1	4.2×10^8	5.7×10^5	6.4×10^3	+	-
G-14	24.1	2.1×10^6	1.2×10^4	0	+	-
G-15	26.3	3.9×10^7	7.6×10^4	3.2×10^2	+	-
G-24	26.8	8.8×10^5	2.5×10^5	5.0×10	-	-
河川水						
N-1	28.1	8.4×10^7	2.3×10^4	0	+	-
N-2	27.9	5.4×10^7	1.2×10^4	0	+	-
N-3	27.4	3.6×10^7	3.5×10^4	0	+	-

研究結果

環境試料および臨床検体ともに PCR で使用する試料は、超純水により沈渣を洗うことで反応阻害を効果的に取除くことができた。環境調査の結果が示すように、コロニーが検出されない河川などにおいてもレジオネラ属特異的な遺伝子や蛍光抗体陽性の菌体は検出された(表2)。また、コロニー数と蛍光抗体による菌体数には100~1000倍の開きがあり、常にコロニー数が下回る傾向を認めた。このような現象は他の調査結果でも確認されており、環境においてレジオネラ菌体の多くは VBNC 状態にあると推測された。PCR 法による検出結果では、プライマーの種類による検出感度の差を認めた。これは標的とする遺伝子の種類と染色体上でのコピー数により生じた現象と考えられる。

栄養飢餓状態と対数増殖期の *L. pneumophila* について菌体の染色性を調べた。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。

RNA の識別染色では、増殖期において RNA 量が多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は、コロニー数と橙色蛍光の菌体数は一致を示した。

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。

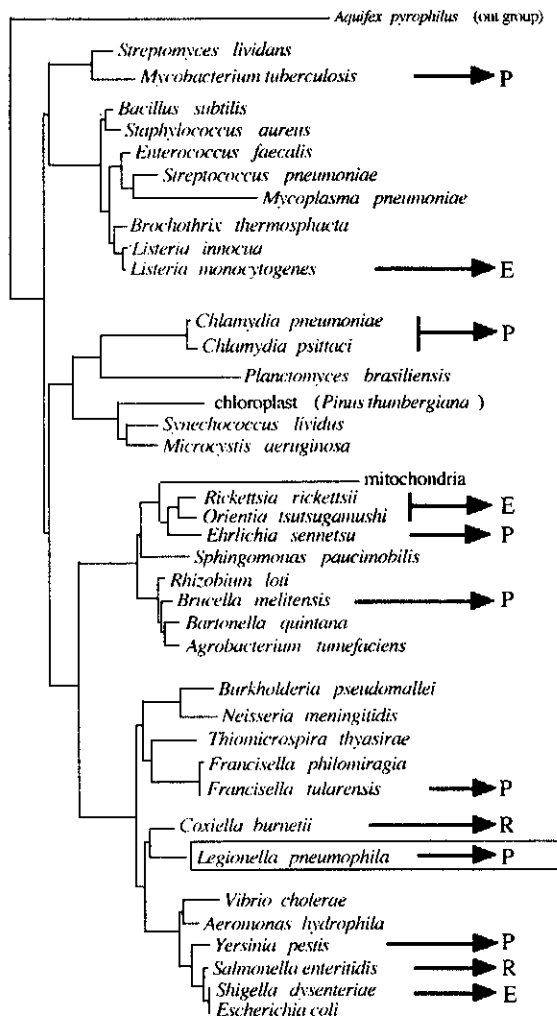


図1 原核生物(細菌、古細菌)の分子進化の系統樹 * 16S rRNAの塩基配列をもとに算出された進化系統樹である。細胞内増殖性細菌はその増殖様式の違いにより以下の記号で示した。

- P: ライソゾームが食胞に融合するのを阻害して食胞内で増殖する
- E: 食胞から細胞質内に脱出して増殖する
- R: リソゾームが融合して消化酵素が放出されても抵抗性を示して食胞内で増殖する

考察

Legionella 属はグラム陰性の好気性細菌で、リボソーム分子による系統分類では Proteobacteria に属する細胞内増殖性細菌で原生動物を宿主とする。1999年2月の時点では45菌種のレジオネラが記載されている²⁾。水や土などの自然環境から多くの菌種が分離されているが、*L. pneumophila* を含む21菌

種は肺炎の症例から原因菌として分離されている。分子進化の系統解析から見ると(図1)、この細菌は *Escherichia coli* などの系統群よりも古い系統に属する。最も近縁な菌種は、やはり細胞内増殖性のQ熱の病原体(*Coxiella burnetii*)であるが、その増殖様式は異なる。古典的な性状検査ではこの *Legionella* 属45菌種を識別することは不可能で、菌体脂肪酸組成や染色体DNAのハイブリダイゼーションが必要である。また図1に示した16S rRNAの塩基配列の分子系統解析結果でも菌種を識別することができる。

1. 蛍光抗体染色法

蛍光抗体法は菌体を検出する方法として広く使われてきた。*Legionella* 属細菌の研究調査においても使われてきたが、他菌種との交差反応の問題から実用には適さないとされてきた。しかし、市販されている抗血清はこのような交差反応性を極力取除いており、実用に耐えうると考える。技術的な問題としては、蛍光色素を標識した抗*Legionella*抗体が国内では販売されていないため間接蛍光抗体法に頼らざるを得ないこと、市販されている抗血清の種類が限定されていることである。

2. 遺伝子検出法

遺伝子の断片を特異的に増幅する polymerase chain reaction (PCR) は遺伝子検出法として優れているが、選択するプライマーの特性により検出感度や特異性に違いが生じる。これまでに報告された *Legionella* 属細菌用のプライマーは4種類である(表1)。初期に作成されたLPプライマーは感度と特異性に問題があり実用に適さない。リボソームのRNA (rRNA) は、生物の分類体系や系統進化を解析するために使われていることから、配列情報が最も多く蓄積されている。このrRNA遺伝子には、分子量が異なる5S (120bp)、16S (1500bp)、23S (2800bp)の三種類がある。塩基数が短い5S rRNAでは属以上のレベルでしか菌種を識別できないが、16Sでは菌種、23Sでは菌株レベルでも識別可能である。*Legionella* 属に特異的でプライマーやプローブに適した配列は、5Sにおいて2種、16Sでは4種が知られている。ただし、16Sの1種と5Sの配列は他の菌種と交差反応を示す。

菌種特異的な配列としては *L. pneumophila* についてのみ知られている。ひとつは mip 遺伝子に対

するプライマー、もうひとつは16S rRNAの特異配列である。*L. pneumophila*の16S rRNAの特異配列は、リボソームを対象とするFISH法のプローブとして利用されている。細菌を検出するためのFISH法では、染色体DNAではなく細胞内に多数存在するリボソームのrRNAを標的とする。PCR法では増幅した遺伝子断片を検出するため、細菌の存在は予測できるが存在数は知ることができない。FISH法では、菌体を検出するため試料中の菌数を推定することができる。

遺伝子を利用した菌種の識別は、塩基配列の情報蓄積されており、適切に設計されたプライマーやプローブを使用すれば容易である。図1に示した系統樹のように16S rRNA遺伝子により多くの菌種を識別することが可能である。しかし、16S rRNA遺伝子の配列上では、15-25塩基数で設計する遺伝子プライマーやプローブに適した配列領域は限られており、PCR法によりすべての菌種を識別できるとはかぎらない。より大きな遺伝子である23S rRNAを使用すれば可能であるが、プライマー設計に必要なデータの蓄積が今のところ不十分である。

3. 生理活性による菌体検出

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。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。例えば、エステラーゼ活性の基質であるCF-DAは増殖期にある細菌細胞内へ効果的に浸透しない。呼吸活性を検出するCTCは*L. pneumophila*において反応性が弱い。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mRNAとrRNAを主に検出している。培養モデル実験では、*L. pneumophila*が対数増殖期の後期よりRNA量の減少した菌体が出現し、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*E. coli*などの場合には観察されない。これは環境条件に応じた細胞内リボソーム数の調節機構の違いに起因すると考えられる。*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、環境試料において菌体の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かもしれない。一方、宿主細胞内に存在する菌体は活発に増殖しており、RNA量に富んだ赤色蛍光を示す。患者検体では、この蛍光染色法により細胞内に存在する細菌を高感度に検出することができた。

生理活性を基準とする検出法では菌種の同定ができない。この問題は、蛍光抗体法やFISH法の併用による二重染色法で解決することができる。またFISH法の感度はリボソーム数に依存するため、上記のRNA識別染色法と同様の結果を得ることができる。ただし、FISH法は手技に依存するところがまだ大きい方法であり、また染色標本の蛍光強度が弱いなどの問題がある。

4. 検査結果の判定基準

土壌や河川などの自然環境、また冷却塔水、給湯給水タンク、浴槽、噴水など我々の生活空間に存在する多くの人工的な水環境からも*Legionella*属の細菌は検出分離されている。冷却塔などでの調査ではコロニー検出が標準法として使われている。すなわち、コロニーが検出できれば感染の危険性が有ると判定してきた。しかし、現在の検査技術では、ここで示したようにコロニーが検出されなくとも特異抗体と反応する菌体やまた遺伝子が検出されるなど従来の判定基準が対応していない結果の生じる場面が出現する。従って、蛍光抗体や遺伝子だけで検出される菌体の存在が感染の危険性を正確に評価するうえでどの程度の意義を持つものなのか検討する必要がある。

患者の臨床材料から*Legionella*属の細菌を検出した場合にはいずれの方法でも結果は陽性と判定できる。すなわち本来はヒトに存在しない細菌が体内にいたことを証明できれば、診断には有用な証拠となる。一方、環境から検出した場合には、いずれの方法で陽性結果が出たかにより危険度の判定は異なる。すなわち、環境試料から培養法ではコロニーが検出されず蛍光抗体染色やPCR法でのみ菌体や遺伝子の存在が検出された場合には、この結果が生菌

に由来するのかを確定することは困難である。培養実験モデルでの結果では、コロニー数が減少しても培養中の菌体の総数には変化がなく、定量PCRによる検出でも極端な菌数減少は観察できない。すなわち、培地上でコロニーを形成しないが菌体には酵素活性や核酸成分の存在が検出されるため、簡単には死菌と判定できない状態 (VNC: viable but nonculturable cell) が観察される。この VNC 状態の *L. pneumophila* をアメーバとともに培養するとアメーバの食胞内で増殖しコロニー形成を示すようになり、ヒトのマクロファージ (monocyte) 食胞内での増殖また動物 (モルモット) への感染発症の能力を回復することが報告されている。

判定基準としては、病原細菌が分離培養できた環境では感染の危険性が高いと判断して検出されたコロニー数に応じた対策を実施する。上記の VNC 菌体が容易に病原性を回復するとするならば、蛍光抗体や PCR でのみ陽性であっても、条件を整えば感染の危険性が増大すると考えてその後の対処 (監視、消毒など) を決めるべきである。*Legionella* 属の細菌が環境に常在する細菌であることを考慮すれば、コロニー検出がなくとも菌体の存在を認めた場合は繁殖の可能性があると考えるべきであろう。

結論

遺伝子、生理活性、菌体 RNA 量を指標とする検出は *Legionella* 属細菌の検査に有効である。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るべき問題点がある。また分離培養が得られず、遺伝子や菌体の存在のみが確認された場合での判定基準や対処法を決める必要がある。

研究発表

論文発表:

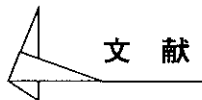
1. 山本啓之: *Legionella* 属細菌の生態とレジオネラ症. *Microbes and Environments* 12:149-156., 1997

2. 山本啓之: レジオネラ属菌とレジオネラ症: 遺伝子による検出法. *臨床と微生物* 25:35-39, 1998
3. 山本啓之, 木暮一啓: Viable but Non-Culturable (VNC) の概念による細菌感染症へのアプローチ. *日本細菌学会雑誌* 54:631-638, 1999
4. 染谷孝, 犬伏和之, 山本啓之, 加藤憲二: 土壌・水圏における Viable but nonculturable (VBNC) 微生物の解析手法の進歩と課題. *土と微生物* 53:45-51, 1999
5. Yamamoto H: Viable but non-culturable state as general phenomenon of non-spore forming bacteria and its modeling. *J Infect Chemother* (in press)

学会発表:

1. Yamamoto H, Takemura H, Kaku M, Shimada J, Nishimura M: Viable but non-culturable cells of *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas putida* in multiple-nutrient starvation. 8th International Symposium on Microbial Ecology, Halifax. 1998
2. Yamamoto H, Kogure K, Ikemoto E, Takemura H, Kaku M, Ikejima H, Shimada J: Viable but non-culturable cells of environmental *Legionella pneumophila* and *Escherichia coli* as potential causative agents of infectious disease. 8th International Congress on Infectious Disease, Boston. 1998
3. 竹村弘, 池島秀明, 國島広之, 寺久保繁美, 山本啓之, 金光敬二, 賀来満夫, 嶋田甚五郎: ヒト単球由来細胞株 THP-1 及びヒト肺胞上皮由来細胞株 A549 を用いた *in vitro* *L. pneumophila* 感染モデルの検討. 第71回日本細菌学会総会, 松本 1998
4. 山本啓之, 木暮一啓: 関連する用語の定義と VNC とそのモデル化. 第2回 VNC 研究会・東京大学海洋研シンポジウム. 1998
5. 山本啓之, 木暮一啓, 賀来満夫, 嶋田甚五郎: 細菌が示す viable but nonculturable 状態の定義と意義. 第79回日本細菌学会関東支部総会. 1998

6. Yamamoto H: VNC as general phenomenon for non-sporulation bacteria and its modeling. 4th Medical Microbiology Interdisciplinary Commission Symposium, Tokyo. 1999
7. 國島広之, 山本啓之, 池島秀明, 竹村弘, 金光敬二, 賀来満夫, 嶋田甚五郎: 蛍光染色法による抗菌薬の作用評価. 第72回日本細菌学会総会, 東京. 1999
8. 山本啓之, 國島広之: 培養不能状態をふまえた新たな検出法; 生体染色法の現段階-細菌の生体染色による抗生物質の影響評価. 第3回VNC研究会・東京大学海洋研シンポジウム. 1999
9. 山本啓之, 國島広之, 竹村弘, 嶋田甚五郎: 薬剤感受性と細菌の生理状態. 第15回日本微生物生態学会, 高知. 1999
10. 山本啓之, 賀来満夫, 嶋田甚五郎: 病原細菌の分離培養と直接検出法におけるViable but Non-culturable菌体の存在と意義. 第73回日本感染症学会総会, 東京. 1999
11. 山本啓之, 木暮一啓: Viable but Non-culturableの定義とモデル. 第72回日本細菌学会総会, 東京. 1999

 文献

1. Amann R, Ludwig W, Schleifer K-H: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-169, 1995
2. Euzéby JP: List of bacterial names with standing nomenclature. < [http://www-sv.cict.fr/bacterio/](http://www.sv.cict.fr/bacterio/) > 1997
3. 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* 64: 2686-2690, 1998
4. Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, DiCesare J, Atlas RM: Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Mol Cell Probes* 4:175-187, 1990
5. Manz W, Amann R, Szewzyk R, Szewzyk U, Stenstrom T-A, Hutzler P, Schleifer KH: In situ identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* 141: 29-39, 1995
6. Miyamoto H, Yamamoto H, Arima K, Fujii J, Maruta K, Izu K, Shiomori T, Yoshida SI: Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water. *Appl Environ Microbiol* 63:2489-2494, 1997
7. 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* 19:21-26, 1987
8. Traganos F, Darzynkiewicz Z, Sharpless T, et al: Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytometric system. *J Histochem Cytochem* 25:46-56, 1977
9. Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T: Comparison of detection methods for *Legionella* species in environmental water by colony isolation, fluorescent antibody staining and polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 37: 617-622, 1993
10. Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T: Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. *FEMS Microbiol Ecol* 20: 149-154, 1996

Signature tagged mutagenesis 法を用いた *Legionella pneumophila* の病原遺伝子の探索

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

比嘉 太

ペンシルベニア大学医学部

病理・臨床検査医学講座¹⁾、内科学講座²⁾

Paul H. Edelstein^{1,2)},
Martha A.C. Edelstein¹⁾

Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model

Atsushi Saito¹⁾, Futoshi Higa¹⁾, Paul H. Edelstein^{2,3)} and Martha A.C. Edelstein²⁾
¹⁾First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Ryukyus ²⁾Department of Pathology and Laboratory Medicine, ³⁾Department of Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine

研究要旨

Signature tagged mutagenesis (STM 法) はランダムな塩基配列の library を用いて変異株の一つ一つに異なった標識をする事により、病原遺伝子を in vivo でスクリーニングする事を可能とした。今回、私たちはこの STM 法を用いて、レジオネラの病原遺伝子の検索を行った。*L. pneumophila* の変異株 1,386 株のライブラリをモルモットに感染させ、2 日後に肺および脾臓から菌を回収したところ、16 株が肺および脾臓から検出されず、非病原性株と判定された。この 16 株の病原性関連遺伝子を検索したところ、6 株が既知のレジオネラの病原遺伝子であった (icmX 2 株、dotB, dotF/icmG, dotO/icmB, proA) が、10 株はレジオネラでは未だ報告のない遺伝子であった。本法を用いる事により、新しい病原遺伝子の存在が明らかとなった。