

厚生労働科学研究費補助金
健康科学総合研究事業

生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究

平成16年度
総括・分担研究報告書

主任研究者 吉田 真一

平成17（2005）年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究	1
吉田 真一	
II. 分担研究報告書	
1. 環境中のレジオネラ汚染実態の調査・研究	17
古畑 勝則	
2. Legionella pneumophila環境分離株の病原性評価と病院給湯設備のレジオネ ラ除菌に関する研究	23
宮本比呂志	
3. Legionella pneumophilaの細胞内増殖性に関与する新規遺伝子pmiAの同定 および機能解析に関する研究	37
三宅 正紀	
4. レジオネラ菌の高感度検出方法の作成と環境スクリーニング法の作成	45
江崎 孝行	
5. レジオネラ肺炎診療の現状に関する研究—京大関連病院における過去5年間の レジオネラレジオネラ肺炎の臨床像	51
田口 善夫	
6. レジオネラ感染症の臨床疫学的診断法の開発に関する研究—特に集団感染事例 を対象とした解析	63
青木 洋介	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	69
IV. 研究成果の刊行物・別刷	73

I. 総括研究報告書

生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究

吉田真一

生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究

主任研究者 吉田 真一 九州大学大学院医学研究院細菌学分野

研究要旨

本研究では生活環境におけるレジオネラ感染を予防するために、

1. レジオネラの自然界における分布と生態を明らかにする、
2. レジオネラの性質とくに病原性の機序とその多様性を知る、
3. 環境中および臨床検体からのレジオネラ迅速検出法と患者の迅速診断法を開発する、
4. レジオネラ感染に対する生体防御の破たんとその病態を解明する、
5. レジオネラ感染症の臨床疫学的データを蓄積し、有効な診断、治療方法を明らかにするとともに、臨床疫学的解析に基づくレジオネラ感染症の確率的診断法を開発する、

という5つの中心テーマを設け、研究を行った。平成16年度は研究の2年目であり、1年目の研究成果を発展させる形で研究が進められた。とくに迅速検出法の研究が精力的におこなわれた。また、班員1名の交代があった。平成16年度の研究結果の概要は以下の通りである。

1. レジオネラの自然界における分布と生態を明らかにする研究

1-1) 昨年度、全国の温泉におけるレジオネラの生息状況を調査した。本年度は分離したレジオネラ株をその病原性、薬剤感受性、パルスフィールド解析に用いた。

1-2) *L. pneumophila* のバイオフィーム形成の機序の研究を続行中である。昨年、37, 42℃で静置培養すると液体培地の界面に形成されたバイオフィームは伸長した繊維状の菌体で形成されていることを報告したが、本年、固形平板培地上で温度37~45℃にて培養された *L. pneumophila* の菌体は高率（95%以上）に100μm以上の長さをもつ線維状菌体に変化することを見いだした。この現象はバイオフィーム形成のモデルになると考えその機序を分子遺伝学的、生化学的、形態学的に解析している。

1-3) 水利用設備からのレジオネラの除菌の研究

病院給湯設備のレジオネラ汚染の実例を示し、その効果的な除菌法を明らかにした（環境感染誌、2004, 483-490）。

2. レジオネラの性質とくに病原性の機序とその多様性を知る研究、

2-1) レジオネラ属菌の遺伝子発現研究への不安定 GFP レポーターの応用

細菌によって産生された unstable green fluorescence protein(GFP)は、細菌が保有するタンパク分解酵素によって分解されやすいため、遺伝子発現をリアルタイムに観察するためのレポーター遺伝子としてすぐれた特性をもっている。この unstable GFP が *L. pneumophila* の in vitro、細胞内での遺伝子発現の研究に応用できることを明らかにした。現在レジオネラのさまざまなプロモーターの発現の解析に用いており、レジオネラの細胞内増殖時の遺伝子発現の動態が明らかにされることが期待される。

2-2) *L. dumoffii* の接着および上皮細胞内侵入機序の解析

L. dumoffii TEX-KL 株はほかのレジオネラ属菌よりも効率よく上皮細胞に接着し侵入できることを見出した。この株にトランスポゾン挿入して変異株を作成し 700 株の中から HeLa 細胞への接着・侵入能が低下している株をスクリーニングによって見出した。解析の結果、トランスポゾンは *L. pneumophila* Lens 株が保有するプラスミド上に存在する遺伝子 TraC と相同性の高い遺伝子の中に挿入されていることがわかった。現在この遺伝子産物について解析中である。

2-3) 細胞内増殖に関わる新規遺伝子 *pmiA* の同定

Legionella pneumophila のアメーバ内及びマクロファージ内の増殖性に関与する新規遺伝子 *pmiA* を同定した。*pmiA* は、既知の細菌遺伝子と相同性を示さず、その遺伝子産物は予測されるアミノ酸配列より三回貫通型膜タンパクであった。*PmiA* 蛋白質は菌の孔形成能に関与する一方、NaCl 感受性に関与しないことから、Icm/Dot とは異なる膜タンパク機能により、菌の細胞内増殖性を制御することが示唆された。

2-4) 水環境から分離された *L. pneumophila* の病原性をアメーバ寒天法で調べ、すべて (215 株) の水環境分離株が病原性を持っていることを明らかにした (感染症誌. 2004, 923-924)。この結果は、「培養検査法は病原株の数を知る定量法である」ことも示している。

3. 環境中および臨床検体からのレジオネラ迅速検出法と患者の迅速診断法の開発研究

3-1) 温泉浴槽水について培養法と LAMP 法を併用してレジオネラ属菌の検出を試み、両者の成績について比較検討したところ、LAMP 法は従来の培養法に比べて検出率が高く、しかも試験操作が簡便なうえ、数時間で判定が可能であることからレジオネラ属菌の迅速検査法の一つとして有用であることを明らかにした。

3-2) FACScan を利用したレジオネラ菌数迅速測定法の開発

レジオネラ特異抗体を蛍光ラベルし、検体を処理することにより FACScan でレジオネラの菌数を測定することができることを明らかにし、実用化に向けた研究を推進した。

3-3) 水および土壌環境中のレジオネラ属菌のスクリーニング法の作成

2003 年度までの研究でレジオネラ属の *dnaJ* 遺伝子を解析し、16S rDNA より多様な遺伝子配列を持っていることを証明してきた。16S rDNA では区別できない菌種を *dnaJ* 遺伝子で検出することで、両遺伝子を標的とした DNA マイクロアレイを作成した。

3-4) 抗原アレイの作成のための抗原の精製とクローニング

レジオネラに対する抗体をスクリーニングするため、15 種類の血清型の LPS 抗原を精製した。また *htpB*, *lipoprotein*, *flaA*, *map*, *mip dotB*, および *proA* の遺伝子産物を発現ベクターにクローニングし、無細胞系で大量の抗原の発現を確認した。

3-5) 気道感染症の高感度検出法の作成

レジオネラ属菌特に *L. pneumophila* の喀痰検査では分離培養が陽性になることが少なく、原因診断の障害になっている。*L. pneumophila* の遺伝子検出方法として *mic* 遺伝子や 16S rDNA が使われ、PCR 法が一般に利用されている。しかしこの方法では治療経過中の菌の生死判断ができない、感度が悪いなどの批判が出ているため、われわれは生菌を検出するといわれている ribosomal RNA を増幅する系を作成し、その評価を行った。

4. 高齢者のレジオネラに対する生体防御の破たんとその病態の研究

現在、老齢マウスを飼育し実験の準備をしている。匹数がそろい次第、免疫能の解析を行う予定である。

一方、2-deoxy-D-glucose(2dG) がマクロファージに作用して *L. pneumophila* の細胞内増殖を抑制する機序の解析を行った。マウスの DNA array を使って 2dG の遺伝子発現への影響をみると、Toll-like receptor 2、TNF-alpha などの遺伝子の発現が抑制されることを見いだした。

5. レジオネラ感染症の臨床疫学的データを蓄積し、有効な診断、治療方法を明らかにするとともに、臨床疫学的解析に基づくレジオネラ感染症の確率的診断法を開発する

5-1) レジオネラ肺炎の実地臨床の現状を把握するために、過去5年間の京都大学医学部呼吸器内科関連病院でのレジオネラ肺炎の症例調査を行い、現在まで29例の症例が集積した。そのなかで、特に診断方法については21例について尿中抗原検査を用いて診断が可能であったことが判明した。従来の他の診断方法と比較し有用性が非常に高いことが明らかになった。

5-2) レジオネラ感染症集団発生の population を対象として、発熱、喫煙歴、基礎疾患、飲酒歴の患者情報のみを臨床項目について、本感染症“疑い”の診断に対する感度、特異度、陽性尤度、および陰性尤度を算出し、血液検査、胸部X線写真、および尿中抗原検出などの検査を行う以前での診断確率(検査前確率)を定量的に求める方法を考案した。

分担研究者

江崎孝行 (岐阜大学大学院医学研究科病原体制御学)

宮本比呂志 (産業医科大学医学部微生物)

古畑勝則 (麻布大学環境保健学部)

田口善夫 (天理よろづ相談所病院呼吸器内科)

三宅正紀 (静岡県立大学薬学部微生物学)

青木洋介 (佐賀大学医学部)

研究協力者：藪内英子 (岐阜大学大学院医学研究科病原体制御学)

飯田健一郎、藤井潤、朴貞玉、Oksana Barysheva、秦天

(九州大学大学院医学研究院)

河村好章 (岐阜大学大学院医学研究科病原体制御学)

縣 邦雄 (アクアス株式会社つくば総合研究所)

馬庭 厚 (天理よろづ相談所病院呼吸器内科)

権平文夫 (デンカ生研)

A. 研究目的

レジオネラ属は元来淡水や土壌に生息する細菌であるが、クーラーの冷却塔や循環式浴槽内で爆発的に増殖してそのミストを吸入したヒトに肺炎を引き起こす。近年はとくに循環濾過式浴場でのレジオネラ症集団発生が起り死者も出たため、とかく注意が循環濾過式浴場に向いているが、レジオネラ感染の危険性があるのは循環濾過式浴場だけではない。これまでと同様、クーラーの冷却塔水、修景水は細菌学的な管理を怠るといつでもレジオネラ感染の危険がある。さらに雑用水の使用適用範囲が広められ、車の洗車や、庭園の散水などエアロゾルが多量に発生する用途に使われることになった。これに対して

もレジオネラ感染予防のための管理を徹底しなければならない。

生活環境におけるレジオネラ感染を予防するために、細菌学者、原虫学者、水質の研究者、ビル管理の専門家などによってレジオネラ対策が研究されているが、本研究班では「研究要旨」に述べた5つのテーマについて研究が行われている。

A-1) 環境水中のレジオネラ汚染の実態を把握しバイオフィーム形成機序など菌の生態についての理解を深めレジオネラ汚染を防ぎ感染を予防すること。

レジオネラ属菌が水環境の中で生活している様式としては、水中を泳いでいるプランクトニック様式のほかに、アメーバの中で増殖する様式とバイオフィームに宿る様式でいる。レジオネラが他種の菌と同じバイオフィームに共存しているという報告はあるが、レジオネラ自らがバイオフィームを形成するかどうかについては報告がなかった。バイオフィーム中に生息するレジオネラに対して有効な消毒剤または抗菌物質を探索することも課題となる。循環風呂や修景水については様々なものが報告されているが、いまだに塩素に頼っているのが現状である。一方、冷却塔水ではブロム系の消毒剤も使われている。できるだけ日常生活に支障をきたさず、不快感をもたらさず、バイオフィーム中のレジオネラにも有効な殺菌剤の開発が急がれる。

昨年度(2003年)全国の温泉のレジオネラ生息状況を調査しその際に全国各地の温泉浴槽水から多くのレジオネラが分離された。本年度は分離された *L.pneumophila* 株の性質を解析し、薬剤感受性試験、パルスフィールドゲル電気泳動による分子疫学的調査も行った。

A-2) レジオネラ属菌の性質、とくにヒトへの病原性について病原因子をあきらかにする。さらに菌側の病原因子と生体側の防御因子を明らかにして治療と予防に寄与する。

A-3) 環境診断と臨床診断の両方が迅速で正確にできるレジオネラ診断法の開発研究を行い、環境汚染と臨床検体の細菌検査を迅速・正確・安価に・網羅的に行うこと。

A-4) レジオネラ症の診断・治療の基準作りを行うとともに、集団発生時に特に問題となる検査をしていないクライアントの確率的診断法の開発、を具体的な研究の目的としている。レジオネラ感染症は四類感染症に分類され全例報告が義務づけられることとなり、診断の精度向上がますます求められている。

B. 研究方法

B-1. レジオネラの自然界における分布と生態に関する研究

1-1) *L. pneumophila* の線維状菌体への変化の機序

固形平板培地上で温度 37~45℃にて培養された *L. pneumophila* の菌体は高率(95%以上)に 100 μm 以上の長さをもつ線維状菌体に変化することを見いだした。この機序を分子遺伝学的には *recA* 遺伝子や *ftsZ* 遺伝子の特徴から、生理学的には温度、炭酸ガス濃度などに焦点を当て、形態学的には光学顕微鏡、電子顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡を駆使して解析している。

1-2) 水利用設備からのレジオネラの除菌

欧米の報告によると、レジオネラ症の 25~45%が院内感染であり、その主な感染源は給水・給湯設備である。国内においても給湯設備が感染源または感染源と疑われる院内感染が発生している。しかし、本邦では、レジオネラ発見の歴史的経緯から病院空調冷却塔水にレジオネラ管理の重点がおかれたまま

であり、病院の給水・給湯設備のレジオネラ汚染に関しては、その実態さえ不明である。病棟浴室のシャワーヘッド拭き取り検査で *L. pneumophila* が検出された大学病院において、中央循環式の給湯設備におけるレジオネラ汚染調査とその除菌を一年間にわたり試みた。

2. レジオネラの性質とくに病原性の機序とその多様性に関する研究

2-1) レジオネラ属菌の遺伝子発現研究への不安定 GFP レポーターの応用

L. pneumophila で最も不安定な GFP は C 末端に AAV を持つもので、2 時間後に 20% までに分解された。現在 *icmS*, *icmT*, *icmQ* のプロモーターを組み替えた菌株を作成し、*in vitro* の growth phase と細胞内での発現のパターンを検討している。

2-2) 細胞内増殖に関わる新規遺伝子 *pmiA* の同定

Acanthamoeba polyphaga 及びヒトマクロファージ様細胞 U937 を使用し、細胞毒性試験、細胞内増殖試験を行った。後期エンドソーム/リソソームマーカーあるいは小胞体マーカーを使った共焦点レーザー蛍光顕微鏡解析及びリソソーム局在性酵素に関する免疫透過電子顕微鏡解析により、感染細胞内の細胞内小器官リクルートメントを観察した。シークエンス解析により変異遺伝子を新規遺伝子 *PmiA* と命名した。バイオインフォマティクスにより *PmiA* を膜局在型蛋白質と予測し、既知の膜局在性病原因子 *Icm/Dot* と機能比較を行うために、菌の赤血球接触溶血活性、NaCl 感受性を調べた。

2-3) *L. dumoffii* の接着および上皮細胞内侵入機序の解析

L. dumoffii TEX-KL 株はほかのレジオネラ属菌よりも効率よく上皮細胞に接着し侵入できることを見いだした。この株にトランスポゾン挿入して変異株を作成し 700 株の中から HeLa 細胞への接着・侵入能が低下している株をスクリーニングによって見出した。

2-4) 水環境から分離された *L. pneumophila* は臨床分離株でないので病原性を有する強毒株かどうかはわからない。そこで、1986 年より 2004 年にかけて国内 (1 都 1 道 1 府 10 県) で分離された 215 株の *L. pneumophila* 環境分離株の病原性をアメーバ寒天法で調べた。

3. 環境中および臨床検体からのレジオネラ迅速検出法と患者の迅速診断法の開発

3-1) 日本各地の温泉浴槽水 125 試料について培養法と LAMP 法を併用してレジオネラ属菌の検出を試み、両者の成績について比較検討を行った。

3-2) *L. pneumophila* 血清群 1 および 4 に特異的な抗体を蛍光ラベルし FACScan で菌数を測定した。

3-3) 水および土壌環境中のレジオネラ菌のスクリーニング法の開発

マイクロアレイは 5 mm x 5 mm のシリコンを使用し、レジオネラ属の 40 菌種の 16S rDNA 配列と *DnaJ* 配列を固定した。レジオネラ属に共通の 16S rDNA を増幅する primer と *DnaJ* を増幅する共通 *DnaJ* primer で増幅し、マイクロアレイと反応させた。Signal は Cy3 標識したキャプチャー probe で検出するように構築した。

3-4) 抗原アレイの作成のための抗原の精製とクローニング

レジオネラに対する抗体をスクリーニングするため、15 種類の血清型の LPS 抗原を精製した。また *htpB*, *liporotein*, *flaA*, *map*, *mip*, *dotB*, および *proA* の遺伝子産物を発現ベクターにクローニングし、無細胞系で大量の抗原の発現を確認した。

3-5) 気道感染症の高感度検出方法の開発

生菌を検出するといわれている ribosomal RNA を増幅する系を作成し、その評価を行った。この方法

では RNA を Guanidium 塩存在下で抽出し、逆転写酵素と T7promotor 付のプライマーで cDNA を合成した。ついで逆転写酵素の DNA polymerase 活性を利用して 2 本鎖の DNA を合成した。さらに T7 RNA polymerase で逆向き rRNA を大量に合成させる反応を採用した。

4. レジオネラ感染に対する生体防御の破たんとその病態の解明に関する研究

2-deoxy-D-glucose(2dG) がマクロファージに作用して *L. pneumophila* の細胞内増殖を抑制する機序を解析した。マウスの DNA array を使って 2dG の遺伝子発現への影響をみると、Toll-like receptor 2、TNF-alpha などの遺伝子の発現が抑制されることを見いだしたので、解析を続行中である。

5. レジオネラ感染症の臨床疫学的データを蓄積し、有効な診断、治療方法を明らかにするとともに、臨床疫学的解析に基づくレジオネラ感染症の確率的診断法を開発する研究

5-1) 一般市中病院臨床において遭遇する頻度の高い市中肺炎のなかでのレジオネラ肺炎の頻度を検討するため、今年度より当院で診療する市中肺炎の前向き検討を実施中である。それらを集計し市中肺炎のなかでのレジオネラ肺炎の位置づけを検証する。診断治療の指針の改訂作業に着手し 17 年度末には草案を取りまとめる。今年度行った症例調査を継続していくとともに、そのなかで患者同意を得てサンプリングした保存尿を、今後更に有用な尿中抗原診断キットの開発に使用していく。

5-2) 平成 14 年度の厚生労働科学研究費補助金による「室内空気中の微生物防止対策に関する研究」-レジオネラ症集団感染事例(平成 14 年、宮崎県日向市日向サンパーク)の疫学調査部会報告書の調査内容に基づき、臨床疫学的診断に必要なレジオネラ感染症の検査前確率を算出する検討を行った。平成 17 年度は、血液検査、胸部レントゲン検査、およびレジオネラ尿中抗原検査などを行った場合の検査後確率についての検討を行う。また、本健康科学総合研究事業の分担研究者である田口によるレジオネラ肺炎事例の臨床的解析結果を参考に、一般市中肺炎重症例におけるレジオネラ肺炎の臨床疫学的診断指針作成についての検討を加える予である。

(倫理面への配慮)

レジオネラ感染症の実態を把握するための病院および臨床検査施設へのアンケート調査にあたってはプライバシーの侵害をしないよう患者名をあげることとはしない。動物実験は、「動物の愛護および管理に関する法律」(昭和 48 年)、「大学における動物実験について(通知)」(昭和 62 年文学情第 141)等、および各研究機関の動物実験倫理指針に基づき、動物愛護の観点から動物に苦痛を与えないように実施する。

【次項以下 C.結果 および D.考察 は、実験方法と同じ順序で記述するが、実験継続中で未だ公表できる結果が出ていない、FACSscan によるレジオネラの同定と菌数測定実験、老齢マウスのレジオネラ感染症に対する抵抗性に関する結果および考察は含まない】

C. 結果

C-1. レジオネラの自然界における分布と生態を明らかにする研究

1-1) *L. pneumophila* の線維状菌体への変化の機序

固形平板培地上で温度 37~45℃にて培養された *L. pneumophila* の菌体は高率(95%以上)に 100 μm 以上の長さをもつ線維状菌体に変化することを見いだした。この機序を分子遺伝学的には recA 遺

伝子や *ftsZ* 遺伝子の特徴から、生理学的には温度、炭酸ガス濃度などに焦点を当て、形態学的には光学顕微鏡、電子顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡を駆使して解析している。

1-2) 水利用設備からのレジオネラの除菌

病棟浴室のシャワーヘッド拭き取り検査で *L. pneumophila* が検出された大学病院において、中央循環式の給湯設備におけるレジオネラ汚染調査とその除菌を一年間にわたり試みた。

2. レジオネラの性質とくに病原性の機序とその多様性を知る

2-1) レジオネラ属菌の遺伝子発現研究への不安定 GFP レポーターの応用

L. pneumophila で最も不安定な GFP は C 末端に AAV を持つもので、2 時間後に実験開始時点の 20% までに分解された。現在 *icmS*, *icmT*, *icmQ* のプロモーターを組み替えた菌株を作成し、*in vitro* の growth phase と細胞内での発現のパターンを検討している。これら三つのプロモーターに関して、これまで stationary phase の発現が高いと報告があったが、われわれの実験では late exponential phase での発現が最も高かった。この unstable GFP が *L. pneumophila* の *in vitro*、細胞内での遺伝子発現の研究に応用できることを明らかにした。

2-2) 細胞内増殖に関わる新規遺伝子 *pmiA* の同定

Acanthamoeba polyphaga 及びヒトマクロファージ様細胞 U937 を使用し、細胞毒性試験、細胞内増殖試験を行った。後期エンドソーム/リソソームマーカーあるいは小胞体マーカーを使った共焦点レーザー蛍光顕微鏡解析及びリソソーム局在性酵素に関する免疫透過電子顕微鏡解析により、感染細胞内の細胞内小器官リクルートメントを観察した。シーケンス解析により変異遺伝子を新規遺伝子 *PmiA* と命名した。バイオインフォマティクスにより *PmiA* を膜局在型蛋白質と予測し、既知の膜局在性病原因子 *Icm/Dot* と機能比較を行うために、菌の赤血球接触溶血活性、NaCl 感受性を調べた

2-3) *L. dumoffii* の接着および上皮細胞内侵入機序の解析

L. dumoffii TEX-KL 株はほかのレジオネラ属菌よりも効率よく上皮細胞に接着し侵入できることを見いだした。この株にトランスポゾン挿入して変異株を作成し 700 株の中から HeLa 細胞への接着・侵入能が低下している株をスクリーニングによって見出した。解析の結果、トランスポゾンは *L. pneumophila* Lens 株が保有するプラスミド上に存在する遺伝子 *TraC* と相同性の高い遺伝子の中に挿入されていることがわかった。現在この遺伝子産物について解析中である。

2-4) 1986 年より 2004 年にかけて国内 (1 都 1 道 1 府 10 県) の水環境から分離された 215 株の *L. pneumophila* 環境分離株の病原性をアメーバ寒天法で調べた。その結果、すべての菌株がアメーバ内で増殖したので、病原性を有することが示唆された。

3. 環境中および臨床検体からのレジオネラ迅速検出法と患者の迅速診断法の開発

3-1) 日本各地の温泉浴槽水 125 試料について培養法と LAMP 法を併用してレジオネラ属菌の検出を試み、両者の成績について比較検討を行った。培養法でレジオネラ属菌が検出された 40 試料については LAMP 法では 38 試料 (95.0%) が陽性を示し、一致率は高かった。また、培養法において不検出であった 85 試料のうち、LAMP 法では 38 試料 (44.7%) が陽性を示し、検出率は高かった。

3-2) 水および土壌環境中のレジオネラ菌のスクリーニング法の開発

マイクロアレイは 5 mm x 5 mm のシリコンを使用し、レジオネラ属の 40 菌種の 16S rDNA 配列と *DnaJ* 配列を固定した。レジオネラ属に共通の 16S rDNA を増幅する primer と *DnaJ* を増幅する共通 *DnaJ* primer で増幅し、マイクロアレイと反応させた。Signal は Cy3 標識したキャプチャー

probe で検出するように構築した。

3-3) 抗原アレイの作成のための抗原の精製とクローニング

レジオネラに対する抗体をスクリーニングするため、15 種類の血清型の LPS 抗原を精製した。また htpB, liporotein, flaA, map, mip dotB, および proA の遺伝子産物を発現ベクターにクローニングし、無細胞系で大量の抗原の発現を確認した。

3-4) 気道感染症の高感度検出方法の作成

生菌を検出するといわれている ribosomal RNA を増幅する系を作成し、その評価を行った。その結果リボソーム遺伝子を増幅する方法より約 100 倍の感度が得られた。使用したプライマーは 16S rDNA 配列を使用しており、レジオネラ属の多くの菌種を増幅できることができる為、レジオネラ感染症診断に幅広く対応できる。

4. レジオネラ感染症の臨床疫学的データを蓄積し、有効な診断、治療方法を明らかにするとともに、臨床疫学的解析に基づくレジオネラ感染症の確率的診断法を開発する、

4-1) 一般市中病院臨床において遭遇する頻度の高い市中肺炎のなかでのレジオネラ肺炎の頻度を検討するため、今年度より当院で診療する市中肺炎の前向き検討を実施中である。それらを集計し市中肺炎のなかでのレジオネラ肺炎の位置づけを検証する。診断治療の指針の改訂作業に着手し 17 年度末には草案を取りまとめる。今年度行った症例調査を継続していくとともに、そのなかで患者同意を得てサンプリングした保存尿を、今後更に有用な尿中抗原診断キットの開発に使用していく。

4-2) 平成 14 年度の厚生労働科学研究費補助金による「室内空気中の微生物防止対策に関する研究」-レジオネラ症集団感染事例（平成 14 年、宮崎県日向市日向サンパーク）の疫学調査部会報告書の調査内容に基づき、臨床疫学的診断に必要なレジオネラ感染症の検査前確率を算出する検討を行った。平成 17 年度は、血液検査、胸部レントゲン検査、およびレジオネラ尿中抗原検査などを行った場合の検査後確率についての検討を行う。また、本健康科学総合研究事業の分担研究者である田口によるレジオネラ肺炎事例の臨床的解析結果を参考に、一般市中肺炎重症例におけるレジオネラ肺炎の臨床疫学的診断指針作成についての検討を加える予定である。

D. 考察

レジオネラ細菌は元来淡水や土壌に生息する細菌であるが、クーラーの冷却塔や循環式浴槽で爆発的に増殖してそのミストを吸入した人に肺炎を引き起こす。レジオネラ感染は冷却塔や循環式浴槽が開発されてから発生が多くなったのは明らかで、一種の文明病といえることができる。これに対する方策の一つはレジオネラが増殖するようなシステムを廃止することである。冷却塔については水冷式から空冷式に替わりつつあるが、循環式浴槽は旅館、ホテル、保養所、ゴルフ場などの業者が高率に導入しており、すぐに廃止するわけにはいかない状況である。従って消毒・殺菌をはじめ、レジオネラ属菌を増やさないような対策が、細菌学者、原虫学者、水質の研究者、ビル管理など専門家による研究がされている。

現代文明はレジオネラの増殖場所を生活環境にたくさん作りだし、レジオネラ感染対策は健全な生活を送るために不可欠となっている。対策は感染源・感染経路対策、早期診断、早期治療に大きくわけることができる。

本研究班は細菌学と呼吸器科学専門家で構成されているので、研究内容はこれまで述べてきたように

(1) レジオネラの生態に関する研究 (2) 病原性の研究 (3) 環境中のレジオネラ属菌の迅速な同定と菌数測定 (4) 患者の迅速診断 (5) 適切な診断法の開発などが主となってくる。

D-1. レジオネラの生態に関する研究

1-1) これまでの研究で *L. pneumophila* が環境中でバイオフィルムを形成することが明らかとなり、温度によってその性質やバクテリアの形態が異なることを示してきた。この現象を遺伝学的に明らかにする研究を行った。

1-2) 水利用設備のレジオネラの除菌

病院給湯施設において、湯待ち時間が長く、湯温が低い給湯栓を選んでレジオネラ培養検査を行うと、レジオネラ汚染率は約 29% と高率であること、その除菌には (1) 給湯水の昇温循環運転 (75℃で 24 時間) とその間の末端給湯栓からの放水作業 (2) 貯湯槽の清掃 (3) 給湯温度を上げて維持管理することが、安価で有用であることを具体的に提供した。レジオネラ院内感染防止に活用されることが期待される。

2. レジオネラの性質とくに病原性の機序とその多様性を知る、

2-1) 不安定 GFP のレジオネラ属菌への応用

unstable green fluorescence protein は細菌によって産生されたあと、細菌が保有するタンパク分解酵素によって分解されやすいため、遺伝子発現をリアルタイムに観察するためのレポーター遺伝子としてすぐれた特性をもっている。*L. pneumophila* は細胞内増殖中に染色性や形態などを変化させ、次の感染サイクルを実現するために (原始的ではあるが) 分化をしていると考えられる。その機序を不安定 GFP を応用して明らかにすることは治療への新しいターゲットになるものと期待される。

2-2) 細胞内増殖に関わる新規遺伝子 *pmiA* の同定

pmiA 変異株は、特にアメーバ内における生存性・増殖性を著しく喪失していることから、PmiA は菌のアメーバ感染に深く関与していると推察される。PmiA と相互作用するアメーバ因子を同定し、それらの機能あるいは相互作用を阻害する物質を探索することにより、*L. pneumophila* のアメーバ内寄生を抑制することが可能であり、自然環境中のレジオネラ感染源の新規根絶法の開発に資する。

2-3) *L. dumoffii* の接着および上皮細胞内侵入機序の解析により、*L. pneumophila* が持たない病原因子を明らかにし多様性を明らかにできる。

2-4) 人工水環境からレジオネラが分離培養された場合には病原株と考え、その水環境の衛生管理を徹底することが望ましい。

3. 環境中および臨床検体からのレジオネラ迅速検出法と患者の迅速診断法の開発

環境中に生息するレジオネラの生息状況・分布・生態を知ることは感染予防の第一歩である。レジオネラの菌種、血清群のみならず、最も分離頻度の高い *Legionella pneumophila* については血清群のみならず分子遺伝学的手法を用いた型別も必要となってくる。さらにそれら環境中から分離される菌種の病原性や薬剤感受性を知る必要がある。

環境中に生息するレジオネラの菌種・血清群とその数を迅速にしかも安価に検査できる方法を開発することが感染源対策に必要となってくる。一方、臨床においても起炎菌の迅速同定検査が求められている。

3-1) LAMP 法の評価

レジオネラ属菌の迅速検査法として LAMP 法を指針に採用することは十分に可能である。しかし、

この場合、遺伝子検査法は培養法と検出原理が異なるため、LAMP法の陽性が必ずしも感染の危険性を示していない点を考慮すべきである。

3-2) 水および土壌環境中のレジオネラ菌のスクリーニング方法の作成

16S rDNAでは区別できない菌種を dnaJ 遺伝子で検出することで、両遺伝子を標的にした DNA マイクロアレイを作成した。この増幅系は DNA の増幅と RNA の増幅産物のどちらにも使用できるようにデザインした。

3-3) 抗原アレイの作成のための抗原の精製とクローニング

この抗原アレイを使い患者の抗体のスクリーニングを行う系を作成する予定である。その中から診断的価値があるものに対して、抗原の検出系、及び抗体の測定系に発展させる予定でいる。

3-4) 気道感染症の高感度検出方法の作成

生菌を検出するといわれている ribosomal RNA を増幅する系を作成し、その評価を行った。細菌の rRNA は増殖が盛んな時は数千個のコピーが合成されているとされており、RNA 検出法は感度の上昇につながる。一方、菌が溶解すると速やかに分解されるため RNA 検出法は生菌の検出方法として認知されつつある。

4. レジオネラ感染症の臨床疫学的データを蓄積し、有効な診断、治療方法を明らかにするとともに、臨床疫学的解析に基づくレジオネラ感染症の確率的診断法を開発する

4-1) レジオネラ症の臨床疫学的調査研究

この症例調査の中で、尿中抗原検査の有用性が高いこと、治療方法については抗菌化学療法においてキノロン系薬の有効性と安全性が実地臨床でも確認された。これらの結果をもとに文献的考察を加えて、診断及び治療指針の改訂を行う。今年度保険適応を得た尿中抗原検査が広く普及することが予想され、指針が実地臨床のなかで一助となる。

4-2) 確率的診断法の開発

平成16年度分担研究で得られた知見は今後レジオネラ集団感染事例が発生した場合に該当する地域の感染母集団を対象とした診療トリアージ（問診のみ、問診+血液・レントゲン検査、あるいは、問診+血液・レントゲン検査+尿中抗原検査、など）において活用される事が期待され、かつ、本診断法の妥当性についての検証を行う必要がある。

E. 結論

本年度を含め、2年間の研究で以下の成果が得られた。

- (1) レジオネラ属の中で *L. pneumophila* のみがバイオフィルムを形成することを明らかにし、温度により菌の形態が異なるなどの重要な新知見を得た。
- (2) 全国の温泉から分離された *L. pneumophila* 菌株はすべて細胞内増殖能があることがわかり、それらを用いて分子疫学的研究が進んだ。
- (3) 迅速診断法の開発では網羅的な遺伝子診断法が開発され、実用化されようとしている。さらに、患者血清を用いた診断に用いられるレジオネラ抗原チップを開発した。
上市された LAMP 法がレジオネラの遺伝子診断法として有効であることを確認した。
- (4) *L. pneumophila* の細胞内増殖に関与する新規タンパクの発見、*L. dumoffii* のシャペロンタンパクが細胞内増殖に必要であることの発見など、*L. pneumophila* とそれ以外の菌種の病原性の

研究が進展し、レジオネラ属の多様性が明らかになりつつある。

(5) 臨床的には、尿中抗原検出による診断が最も有効であり、治療薬としてニューキノロン系薬剤が有効であることを明らかにした。

(6) 集団発生事例に Bayes 法を応用する研究が始まった。

さらに、今後は

(7) レジオネラの DNA array がほぼ完成し使用できるので、アレイを使ってレジオネラの生態と病原性の解析を推進したい。また、開発したレポーター遺伝子を使って遺伝子発現の研究を行う。

(8) FACScan を使ったレジオネラ菌種・菌数迅速診断法を開発し実用化したい。

(9) 老齢マウスのレジオネラ感染抵抗性についての研究

などの開発・研究も推進する予定である。

F. 健康危険情報

「該当なし」

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 古畑勝則, 宮本比呂志, 福山正文: 市販園芸用土からのレジオネラ属菌の分離状況および分離株のアメーバ内増殖性と薬剤感受性. 環境感染, 19: 306-310 (2004)

2) 安中敏光, 小島 禎, 池戸正成, 古畑勝則: LAMP 法による環境水からの Legionella 属菌の検出. 防菌防黴誌, 32: 195-201 (2004)

3) 古畑勝則, 原 元宣, 福山正文: Legionella pneumophila 血清群 1 群のパルスフィールドゲル電気泳動パターン. 防菌防黴誌, 32: 287-291 (2004)

4) 古畑勝則, 原 元宣, 福山正文, 吉田真一: 温泉水由来 Legionella pneumophila の薬剤感受性. 防菌防黴誌, 32: 343-347 (2004)

5) 古畑勝則, 原 元宣, 福山正文, 吉田真一: 温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況. 感染症誌, 78: 710-716 (2004)

6) Furuhata, K., Annaka, T., Ikedo, M., Fukuyama, M., Yoshida, S.: Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and conventional culture for the detection of Legionella species in hot spring water samples in Japan. Biocontrol Sci., (in submitting)

7) 宮本比呂志, 瓜生佳世, 吉村博子, 谷口初美: アメーバ寒天法を使用した Legionella pneumophila 環境分離株の病原性評価. 感染症学雑誌 2004; 78(10): 923-924.

- 8) 宮本比呂志、池野貴子、吉村博子、谷口初美、松本哲朗：病院給湯設備におけるレジオネラ汚染とその除菌. 環境感染 2004; 19(4): 483-490.
- 9) 宮本比呂志、吉田真一：レジオネラの病原性発現機構. Mebio 2004; 21(12): 63-68.
- 10) Miyake M, Fukui T, and Imai Y. : Immediate cessation of protein synthesis in *Legionella pneumophila* avirulent strains at an early stage of infection in macrophages and amoebae. Cell. Microbiology (submitted)
- 11) Sze CC, Piao ZY, Takade A, and Yoshida S. : Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilm by *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. (submitted)
- 12) Ohnishi H, Mizunoe Y, Takade A, Tanaka Y, Miyamoto H, Harada M, and Yoshida S.: *Legionella dumoffii* DjlA, a member of the DnaJ family, is required for intracellular growth. Infect. Immun. 72(6):3592-3603, 2004
- 13) Irie M, Miyamoto H, Ikeda M, and Yoshida S.:
A 3-year follow-up study of anti-*Legionella* antibodies in users of Japanese 24-hour hot water baths. J. Occup. Health 46:68-77, 2004
- 14) 江崎孝行: ゲノム情報を使った感染症の網羅的診断法. 微生物はなぜ病気をおこすのか. 日本細菌学会 クバプロ. 2004. 187-195.
- 15) 江崎孝行, 大楠清文, 河村好章: DNA マイクロアレイを用いた環境サンプル中の微生物群集の解析. 難培養微生物研究の最新技術. 工藤俊章, 大熊盛也 (監修), シーエムシー出版 (東京), p94-100, 2004
- 16) Niwa T., Kawamura Y., Katagiri Y., Ezaki T.
Lytic enzyme, labiase for a broad range of Gram-positive bacteria and its application to analyze functional DNA/RNA, J. Microbiol. Methods, in press.
- 17) 江崎孝行, Yuing Li, 大楠清文, 河村好章:呼吸器感染症の網羅的診断に向けて. 分子呼吸器病. 8:341-344. 2004
- 18) 大楠清文, 江崎孝行:これからの微生物検査 遺伝子検査. 臨床と微生物. 31:610-622, 2004.
- 19) Miyake M., Fukui F., Imai Y.: Immediate cessation of protein synthesis in *Legionella*

pneumophila avirulent strains at an early stage of infection in macrophage and amoebae. (2005) *Microbes Infect.* (submitted)

- 20) Miyake M., Watanabe T., Koike H., Molmeret M., Imai Y., Abu Kwaik Y.: Characterization of *Legionella pneumophila pmiA*, an essential gene for infectivity to protozoa and macrophages. (2005) *Infect. Immun.* (submitted)

2. 学会発表

- 1) 古畑勝則：レジオネラ属菌の汚染対策と検査法の将来展望（パネルディスカッション）。日本防菌防黴学会第31回年次大会（2004.5）東京。
- 2) 古畑勝則：レジオネラ属菌の試験法（現状と問題点）（講演）。日本防菌防黴学会2004年度秋季合同シンポジウム（2004.10）福井。
- 3) 宮本比呂志：レジオネラ属菌の細菌学的特性 日本防菌防黴学会 第31回年次大会 パネルディスカッション：水環境におけるレジオネラ属菌検査法の現状と将来,平成16年5月,東京
- 4) 宮本比呂志：アメーバ寒天法を使用した *Legionella pneumophila* 環境分離株の病原性評価 第57回 日本細菌学会九州支部総会,平成16年9月,福岡
- 5) 宮本比呂志：アメーバとレジオネラの宿主寄生体関係 第57回 日本寄生虫学会南日本支部大会 特別講演,平成16年10月,北九州
- 6) 宮本比呂志：病院給湯設備のレジオネラ汚染とその除菌 第20回 日本環境感染学会総会,平成17年2月,神戸
- 7) 朴貞玉、史君緯、飯田健一郎、Barysheva Oksana,吉田真一： *Legionella pneumophila philadelphia-1* のバイオフィルムの形態を調節する温度依存性プロモーター領域の解析
- 8) Ezaki T.
Realtime PCR and Microarray for rapid and comprehensive detection and identification system of pathogenic bacteria. Japan-Korea Joint international Symposium Soul. Korea, 2004.
- 9) 江崎孝行
Relatime PCR 及びマイクロアレイを使用した環境中の微生物のモニタリングシステム
東京大大学水環境制御研究センターシンポジウム、東京、2004.
- 10) 江崎孝行

感染症の網羅的遺伝子診断方法の研究開発. 岐阜大学フォーラム、岐阜、2004

11) 江崎孝行

網羅的感染症診断システム、バイオ Japan, 横浜、2004.

12) 江崎孝行、大楠清文

高感度な RNA の増幅方法 NASBA 法の使用経験、日本自動機器分析学会、横浜、2004.

13) 山田博子、河村好章、江崎孝行

オリゴ DNA マイクロアレイ及び3次元 DNA マイクロアレイを用いた消化器系感染症診断技術の開発
第 77 回日本細菌学会総会、大阪、2004.

14) 大楠清文、山田博子、大塚喜人、河村好章、江崎孝行

細菌ゲノム DNA/RNA の効率的な抽出方法の開発：糞便および喀痰からの効率的 DNA/RNA 精製方法の確立にむけて

第 78 回日本感染症学会総会、東京、2004.

15) 河村好章、三島徳子、劉宏生、大楠清文、江崎孝行

dnaJ sequence の細菌分類の指標としての可能性

第 41 回日本細菌学会中部支部総会、岐阜、2004

16) 大楠清文、三島徳子、大塚喜人、河村好章、江崎孝行

迅速な塩基配列決定による菌種の同定法を臨床検査室でどのように利用するか？

第 17 回臨床微生物迅速診断研究会、大阪、2004

17) 江崎孝行、神山崇、Shah M. Mohammad, 大楠清文、河村好章

Realtime PCR 及びマイクロアレイを用いた微生物の網羅的な解析方法の研究開発

第 24 回日本微生物系統分類研究会年次大会、伊東、2004.

18) 原田俊彦、今井康之、三宅正紀

Legionella pneumophila のマクロファージ NADPH オキシダーゼ産生活性酸素による殺菌機構からの回避

第77回日本細菌学会総会（大阪）平成16年4月2日

19) 林豪士、三宅正紀、辻勉、今井康之

免疫系特異的アクチン結合蛋白p57のレジオネラ感染における特有なリクルートメントについて

第77回日本細菌学会総会（大阪）平成16年4月2日

20) Masaki Miyake, Takurou Watanabe, Maëlle Molmeret, Yasuyuki Imai, Yousef Abu Kwaik.

Characterization of *Legionella pneumophila pm1* locus which has a great influence on infectivity to protozoa.

104rd ASM general meeting (New Orleans) May 26, 2004.

21) 原田俊彦、三宅正紀、今井康之

レジオネラ属菌の食細胞NADPHオキシダーゼ産生活性酸素による殺菌からの回避機構について
ファーマ・バイオフィォーラム2004(東京) 平成16年11月6日

22) 林豪士、三宅正紀、伊藤佐生智、辻勉、今井康之

アクチン結合蛋白質p57のレジオネラ感染における特異的挙動について
16年度日本薬学会東海支部例会(静岡) 平成16年12月4日

23) 馬庭 厚 当院のレジオネラ症診療の現状 第2回奈良感染症検査フォーラム 2004.9.16

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許

1-1) Dnajを使用した微生物の同定・検出方法に関連した特許出願を準備中

1-2) 微量の臨床材料から破碎困難な微生物のDNA/RNAを効率良く抽出する方法
(特許申請済み)

1-3) Silicon arrayの検出方法(特許申請準備中)

1-4) 多種類のRNAを高温で同時に増幅する新しい増幅法(特許出願準備中)

2. 実用新案登録

「該当なし」

3. その他

「該当なし」

II. 分担研究報告書

1. 環境中のレジオネラ汚染実態の調査・研究

古畑勝則

2. *Legionella pneumophila* 環境分離株の病原性評価と病院給湯設備のレジオネラ除菌に関する研究

宮本比呂志

3. *Legionella pneumophila* の細胞内増殖性に関する新規遺伝子 *pmiA* の同定および機能解析に関する研究

三宅正紀

4. レジオネラ菌の高感度検出方法の作成と環境スクリーニング法の作成

江崎孝行

5. レジオネラ肺炎診療の現状に関する研究—京大関連病院における過去5年間のレジオネラレジオネラ肺炎の臨床像

田口善夫

6. レジオネラ感染症の臨床疫学的診断法の開発に関する研究—特に集団感染事例を対象とした解析

青木洋介

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

環境中のレジオネラ汚染実態の調査・研究
分担研究者 古畑勝則 麻布大学環境保健学部助教授

研究要旨

日本各地の温泉浴槽水 125 試料について培養法と LAMP 法を併用してレジオネラ属菌の検出を試み、両者の成績について比較検討を行った。培養法でレジオネラ属菌が検出された 40 試料については LAMP 法では 38 試料（95.0%）が陽性を示し、一致率は高かった。また、培養法において不検出であった 85 試料のうち、LAMP 法では 38 試料（44.7%）が陽性を示した。このように LAMP 法は従来の培養法に比べて検出率が高く、しかも試験操作が簡便なうえ、数時間で判定が可能であることからレジオネラ属菌の迅速検査法の一つとして有用であった。

A. 研究目的

近年、日本では浴槽水を感染源とする集団感染事例が相次ぎ、浴槽水の衛生的管理の強化が求められている。浴槽水中のレジオネラ属菌数を監視するには培養法による検査が必要であるが、選択培地上での発育が非常に遅いため、試験成績が出るまでには 7 日から 10 日を要しているのが現状であり、これは培養法の限界である。試験結果が遅れることは対策の遅れにつながり、結果的に患者数の拡大が懸念される。また、殺菌対策実施後の検証の遅れは長期間の営業停止による大きな経済的損失を招く。こうしたことから、培養法に替わる浴槽水におけるレジオネラ属菌迅速検査法の確立が強く望まれている。

一方、遺伝子増幅法による病原微生物の検出は数時間程度で行えることは周知の事実である。なかでも新しい遺伝子増幅法である LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法は従来の PCR (Polymerase Chain Reaction) 法に比べ、感度及び操作性ともに優れており、レジオネラ属菌の検出に関する基礎的検討も進んでいる。

そこで、今回は日本各地の温泉浴槽水について培養法と LAMP 法を併用してレジオネラ属菌の検出を試み、両者の成績について比較検討を行った。

B. 研究方法

1. 供試材料

2004 年 3 月から 11 月の間に、20 道都県において採取した温泉水（500ml）125 試料を試験に供した。地方での採取の場合は冷蔵にて輸送した。原則的に浴槽水であるが、一部源泉や湯口水も含まれた。