

4. GB112 株の変異遺伝子の同定及びその遺伝子相補株の細胞毒性・細胞内増殖性

プラスミド pB-3 を用いて、mini-Tn10::kan 挿入領域の塩基配列解析を行った。その結果、Legionella Genome Project データベースのコンティグ CTG. BC. 2E103D6. 21. 05. 082701 内の 915bp の大きさを持つ ORF (ORF915) 内に、mini-Tn10::kan の挿入部位があることがわかった。ORF915 の前後には転写方向が同じと考えられる四つの ORF (ORF876, ORF1185, ORF783, ORF2484) が存在することが分かった。また、ORF915 に関しては既知の細菌遺伝子で相同性がみられる遺伝子は存在しなかった。ORF915 のみをプラスミドで GB112 株に導入することによって相補株 GB112C-5 を作製し、その宿主細胞毒性・細胞内増殖性を調べたところ、野生株とほぼ同様の性状が観察された。よって、GB112 株の性状に起因する遺伝子は ORF915 で、その上流及び下流の遺伝子の影響はないことが分かった。この ORF915 を *pmiA* と命名した。

5. *pmiA* のレジオネラ属菌種における普遍性

pmiA は、*L. pneumophila* 血清群 1 (serogroup 1, SG1) の AA100 株、JR32 株、Lp02 株、SG5 の GTC297 株、SG6 の GTC748 株及び SG7 の GTC750 株の各菌株に存在した。一方、*L. bozemanii*、*L. micdadei*、*L. dumoffii*、*L. brunensis* 及び *L. gratiana* には存在せず、*pmiA* が *L. pneumophila* 種特異的な遺伝子であることが示唆された。

6. PmiA 蛋白質の二次構造

PmiA の 41 番目～66 番目及び 190 番目～280 番目のアミノ酸領域で疎水性ドメインを形成していることが予想された。さらに、予想された疎水性ドメイン内の 55 番目～66 番目、199 番目～240 番目及び 258 番目～272 番目のアミノ酸領域では α -ヘリックスを形成し、また、53 番目～75 番目、214 番目～236 番目及び 259 番目～281 番目のアミノ酸領域は、膜貫通ドメインを形成することが推測された。よって、PmiA は 3 回膜貫通型蛋白質であることが予測された。

7. GB112 株及び *icm/dot* 変異株の性状比較

PmiA が膜貫通型蛋白であると予測されたため、*L. pneumophila* の代表的な病原因子で菌の細胞内増殖性に関与する膜蛋白質群 Icm/Dot との機能比較を目的として、Icm/Dot 蛋白複合体の構成因子 DotA 変異株 LELA3118 及び *icmT* 変異株 GS3011 を用いて以下の実験を行った。

7-1 赤血球溶血試験

L. pneumophila の哺乳細胞膜への孔形成能 (pore-forming activity) が、Icm/Dot 機能に依存しているというこれまでの報告から、羊赤血球細胞を利用して菌接触時の溶血性を調べることで、菌の孔形成能を評価した。AA100 株は強い溶血活性を示したが、LELA3118 株、GS3011 株及び AA100 加熱殺菌では、ほとんど溶血活性がみられなかった。一方、GB112 株については、Icm/Dot 変異株 LELA3118 及び GS3011 と同様に溶血活性がみられなかった。また、相補株 GB112C-5 で溶血活性が回復したことから、PmiA が菌の孔形成能に関与することが示唆された。

7-2 NaCl 感受性試験

L. pneumophila の NaCl に対する感受性が Icm/Dot 機能に依存するというこれまでの報告から、菌の NaCl 感受性試験を行った。AA100 株は NaCl 含有培地でコロニー形成の阻害がみられた。一方、LELA3118 株は NaCl の有無とは関係なく、両培地でほぼ等しい数のコロニー形成がみられた。GB112 株は AA100 株と同様に NaCl 含有培地でコロニー形成の阻害がみられた。それぞれの菌株の NaCl 非含有培地に形成されたコロニー数に対する NaCl 含有培地に形成されたコロニー数の割合を算出した。この値の 1 は、NaCl に非感受性であることを示し、値が低いほど NaCl に対する感受性が高いことを示す。AA100 株は 0.064 で高感受性を示し、LELA3118 株は 1.017 で非感受性であった。一方、GB112 株は 0.255 で感受性を示した。このことから、PmiA は、Na⁺、Cl⁻イオンの菌体膜内外の輸送に関与しないことが示唆された。

D. 考察

これまでに *L. pneumophila* の細胞内増殖性に関与する遺伝子として、*icm/dot* をはじめ *mip*、*milA*、*htrA*、*pilD*、*csrA*、*lvgA*、*ptsP* など様々な遺伝子が報告されている。現在分離されている 89 の *pmi* 変異株のうち 86 株は、*icm/dot* 領域以外に変異を持つことが確認されており、*L. pneumophila* が両宿主内で共通に必要とする遺伝子が多く存在することが示唆される。また *pmi* 変異株は、主にアメーバ及びヒトマクロファージ内での増殖性や宿主細胞に対する細胞毒性の程度をもとに 5 つのグループに分けられている。GB112 株は、細胞内増殖性の著しい低下のみられる Group 1 に分類されており、その変異遺伝子は宿主細胞内での増殖性、生存性に深く関与しているものと考えられる。U937 細胞及び *A. polyphaga* を使用して、GB112 株の細胞内増殖性及び細胞毒性を検証したところ、いずれの細胞に感染させた場合でも親株である AA100 株と比較してそれらの低下がみられた。しかしながら、U937 細胞内での増殖性に関しては、感染直後から 48 時間後までを通じて野生株より約 1/10 程度以下の菌数減少に留まり、むしろ Group 3 に属する *pmi* 変異株に類似した増殖性を示した。しかしながら、*A. polyphaga* 内では、感染後 24 時間ですでに殆どの菌が死滅するような著しい増殖性の低下がみられ、両宿主での増殖性低下の程度が異なる結果を得た。今回我々が得た結果と分離された当初の報告が異なる原因は定かではないが、使用細胞の状態、感染 MOI の違いなどの感染条件が異なることが考えられる。また、感染菌液の調製方法に関して、寒天培地に形成されるコロニーをかき集めて菌の懸濁液を調製すると、様々な growth phase の菌が混在することになるが、著者は液体培地で対数増殖期後期まで培養することで増殖相を均一にした菌液を感染に使用した。Swanson らによって、*L. pneumophila* の様々な性状は増殖相に依存し、病原性に関連する表現型は対数増殖期後期に発現されると報告されていることから、著者が採用した方法及びそれにより得た結果は、菌の病原性状を検討する上で妥当性があると考えられる。

GB112 株の U937 細胞感染 4 時間後では、加熱死菌を貪食させた場合とほぼ同程度の約 70% のファゴソームで LAMP-1 及び LAMP-2 の集積が起こり、また、病原株感染に特徴的な KDEL 配列を有する小胞体蛋白質の集積はみられるものの、野生株感染時よりも少なかった。このことは、GB112 を含むファゴソームでは、そのほとんどがリソソームとの融合を起こしており、病原株感染特異的な小胞体のリクルートメントが阻害されていることを示唆した。一方、*A. polyphaga* 感染では、ほとんどの GB112 株を含むファゴソームの空胞領域が野生株より広く、そこには多くの酸性フォスファターゼ酵素基質反応生成物の沈殿物が観察された。従って、GB112 株は *A. polyphaga* 内でも感染初期におけるファゴソームのリソソームとの融合により、菌の細胞内増殖が阻害されたと考えられる。これらの結果から、GB112 株の変異遺伝子は、U937 細胞及び *A. polyphaga* 両細胞への感染初期におこるファゴソーム-リソソーム融合の阻害、あるいは replicative phagosome の形成に必要な小胞体やリボソーム等の細胞内小器官のリクルートメントを誘導するために何らかの機能を果たしていることが推察された。

GB112 株変異遺伝子 *pmiA* の前後には転写方向が同じ 4 つの ORF が存在し、これらは、*Agrobacterium tumefaciens* の ABC トランスポーターや、*E. coli* の Acyl-CoA dehydrogenase 遺伝子など既知の細菌遺伝子と相同性がみられた。*L. pneumophila* と同じく細胞内寄生菌である *Yersinia pestis* の ABC トランスポーター Yfe は、病原性発現に重要な無機鉄の獲得に関与し、また、Type IV 分泌装置を保持する *A. tumefaciens* は植物細胞への接着に関しても ABC トランスポーターシステムが機能し病原性に関与していることが知られている。これらの ABC トランスポーターは複数の ORF からなり、その中のいくつかは、ポリシストロン性の mRNA で構成されている。これらの事実より、ORF915 を含む前後 5 つの ORF 全てあるいは一部がオペロンを形成し、*pmiA* の発現がその下流あるいは上流の遺伝子の極性効果による影響を受けている可能性が考えられた。しかしながら、*pmiA* のみの遺伝子補完により GB112 株の性状が回復し、*pmiA* は単独でオペロンを形成し、前後の ORF の影響はないことがわかった。

本研究で我々が明らかにした新規遺伝子 *pmiA* が *L. pneumophila* 特異的に存在している可能性に関して、レジオネラ症の原因菌で *L. pneumophila* が圧倒的に多い原因として特異的な病原因子の存在が示唆されていることを考えると、非常に興味深い。GB112 株は U937 内よりむしろ *A. polyphaga* 内における増殖性の低下が著しいことから、*pmiA* が特にアメーバ内での増殖性に影響を与える遺伝子であると

える。また、U937内では、菌が *pmiA* に依存することなく増殖性を保つことができるような *A. polyphaga* には無い別な機構を利用できることも推察される。自然環境中での *L. pneumophila* は、菌が単独で生存しているより、むしろアメーバなどの原生動物内に寄生している割合が高く、また、ヒトへの感染を考えた場合もアメーバなどの原生動物内に寄生した状態で菌の感染を受けるケースがほとんどであると考えられる。*pmiA* が *L. pneumophila* 特異的な遺伝子であれば、レジオネラ症患者や環境からの分離例が圧倒的に *L. pneumophila* が多い理由として、*L. pneumophila* が *pmiA* を保持していることによって、環境中であるいは感染源となるアメーバ内に保持されやすくなることも考えられる。このようなことから、今後、PmiA 蛋白質とアメーバ内で相互作用する特異的な因子を同定し、その増殖性に関わる一連の機構を解明すれば、菌のアメーバ内での増殖性を制御する、あるいは菌のアメーバ内への寄生性を低下させることにより、感染源となる環境中の *L. pneumophila* を減少させることが可能であり、レジオネラ感染防止の新たな策を講じる可能性が十分あると考える。

L. pneumophila の代表的な病原因子 Icm/Dot は、菌体膜上で形成される Type IV 分泌装置としてエフェクター分子の分泌に関与することで菌の細胞内増殖性を制御し、*L. pneumophila* の病原性発現に最も重要な機能を果たしているが、その他、様々な菌体分子の分泌あるいは輸送に関わるトランスポーターあるいはポンプとしての機能を有しているという報告がなされている。*L. pneumophila* は哺乳類細胞膜に対して、孔形成活性を有するが、この活性は、菌が宿主に侵入する際、宿主細胞膜に孔をあける時、あるいは十分に細胞内増殖をした後、新たな宿主へ感染する際に細胞から脱出すべく細胞膜を破壊する (necrosis) ために必要とされると考えられている。Icm/Dot 変異株ではこの活性が欠如することから、孔形成活性は Icm/Dot 機能依存的である、すなわち、孔形成活性を有する未知の菌体因子の菌体外放出が Icm/Dot によって行われていると考えられている。一方、*L. pneumophila* の多くの病原株は、NaCl に対して感受性を示すことが以前から知られ、菌の病原性と NaCl 感受性には相関があると推測されている。これに関しては、ほとんどの Icm/Dot 変異株が NaCl 耐性を示すことから、菌の NaCl 感受性には Icm/Dot が関与し、Icm/Dot が菌体膜上で Na イオン、Cl イオンの内外への流出入を調整しているためであると説明されている。これらの事実を根拠に、PmiA の Icm/Dot との膜蛋白質としての機能の異同を明らかにするために、上記の菌の孔形成能及び NaCl 感受性に着目して、PmiA 変異株 GB112 のそれらの性状について、病原株及び Icm/Dot 変異株と比較検討した。

羊赤血球への溶血作用を利用した孔形成活性を調べたところ、GB112 株は孔形成活性をほとんど示さず、DotA 変異株及び IcmT 変異株とその活性は同程度であった。従って、PmiA は Icm/Dot の孔形成能に関与する機構と類似した機構によって菌の孔形成活性に寄与しており、その一つの可能性として PmiA が孔形成因子のトランスポーターとして何らかの関与をすることが推測された。しかしながら、GB112 株の NaCl 感受性を調べたところ、*icm/dot* 変異株が示す NaCl 耐性ではなく、殆どの病原株が示す NaCl 感受性を示した。このことから、PmiA は Icm/Dot とは異なり、Na⁺、Cl⁻イオンの膜内外の輸送には関与しないことが推測された。GB112 株では *icm/dot* 領域に変異はないため、ネイティブな Icm/Dot ポンプによって NaCl 感受性が維持されていると推測される。これらの結果は、PmiA と Icm/Dot が異なる膜蛋白機能により菌の細胞内増殖性に関与することを示唆するものであった。

pmi 変異株の中で、GB112 株の他にいくつか NaCl 感受性の株が分離されている。これらの変異遺伝子は未だ同定されていないが、*icm/dot* 領域の変異でないことがサザンブロットニングにより証明されており、これらの株についても GB112 株と同様に、Icm/Dot によって NaCl 感受性が維持されていると推測される。*L. pneumophila* の NaCl 感受性に関する明確な説明はなされていないが、これらを考え合わせると、最近ではすでに疑問視されているように、菌の病原性と NaCl との相関は必ずしもあるとは言えないと考えられる。また、*L. pneumophila* の孔形成に関しては、最近 IcmT および IcmQ の関与が報告されており、PmiA のこれらとの関連についても現在検討中である。Icm/Dot が関与するその他の菌の性状に関しては、マクロファージ感染初期におけるアポトーシス誘導があげられる。Abu Kwaik らは、病原株感染マクロファージでは、感染直後にアポトーシスが始まり、菌が十分増殖した感染後期に膜への孔形成による necrosis でその崩壊が起こるといふ感染マクロファージの 2 段階死 (biphasic death) を提唱している。このモデルにおいて、病原株の感染後期での孔形成活性と共に、さらに感染

初期段階に起こるアポトーシス現象も、Icm/Dot 機能依存的であることが示されている。今後、PmiA のアポトーシス誘導活性あるいはエフェクター分泌能に関して明らかにすることで、Icm/Dot との機能の異同についてさらなる見解が得られるものと考えられる。

E. 結論

- 1) *L. pneumophila* の細胞内増殖性に関与する新規遺伝子 *pmiA* を同定した。*pmiA* は、*Legionella* 属内において *L. pneumophila* 種特異的な遺伝子である可能性を示した。
- 2) *pmiA* 変異株は、U937 及び *A. polyphaga* 両宿主感染において、細胞内増殖性及び細胞毒性の低下を示し、特に *A. polyphaga* 感染におけるそれらの低下が著しいことを見出した。また、両宿主内では、感染初期に菌を含むファゴソームのリソソームとの融合が起こり、このことが菌の細胞内増殖性低下の一因となることを明らかとした。さらに、U937 細胞の *pmiA* 変異株感染における細胞内小器官のリクルートメントは、病原株感染時と異なることを示し、*pmiA* 変異株の感染様式が病原株と異なることが推察された。
- 3) *pmiA* がコードする機能蛋白質 PmiA は 3 回膜貫通型蛋白であることが推察された。また、*pmiA* 変異株は *icm/dot* 変異株と同じく孔形成活性を示さない一方、病原株と同じく NaCl 感受性を示したことから、PmiA は、*L. pneumophila* の代表的な病原因子 Icm/Dot とは異なる膜蛋白機能を介して菌の宿主細胞内での増殖・生存に関与していることを示した。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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)
2. 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. 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
2. 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
3. Masaki Miyake, Takuro Watanabe, Maëlle Molmeret, Yasuyuki Imai, Yousef Abu Kwaik.
Characterization of *Legionella pneumophila pmi* locus which has a great influence on infectivity to protozoa.
104rd ASM general meeting (New Orleans) May 26, 2004.
4. 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・バイオフォーラム2004 (東京) 平成16年11月6日
5. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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

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分野)

研究協力者：丹羽隆、大楠清文、飯原大念、今西義紀、河村好章

研究の要旨

レジオネラ感染症の診断のために下記の研究開発目標のための実験を行った

1. レジオネラの気道感染症を診断する mRNA の高感度検出方法
2. 水および土壌環境中のレジオネラ菌を含めた人病原体のスクリーニング方法
3. 抗原アレイの作成のためのレジオネラ抗原抽出法の基礎的な検討

A. 研究目的

レジオネラの感染症の診断では菌の分離の他に尿中抗原の検出、喀痰の PCR 法が確立されているが、いずれの方法も診断に際して問題がある。培養方法は最も重要な方法であるが、喀痰からの分離率が悪いのと培養に 3-7 日と時間がかかり、迅速な対応が出来ないという問題がある。尿中抗原の検出は最も簡便な方法であるが、*L. pneumophila* の血清型 1 にしか対応できないので、すべてのレジオネラ菌種に利用出来ないという欠点がある。

PCR 法による DNA 検出は既に多くの研究室では利用されているが、保健適応になっておらず、研究目的の利用にとどまっている。患者の抗体を測定する方法もキット化された製品はなく標準化された抗体価の計測が出来ない状況になる。このように疾病が認知されてから 25 年以上が経過した今日でも診断体制が十分に整備されていないので、本研究では下記の 3 つの課題に向かって研究を推進している。

A-1) レジオネラの気道感染症を診断する mRNA の高感度検出方法

レジオネラ菌特に *L. pneumophila* の喀痰検査では分離培養に失敗することが多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 法が研究者の間では利用されてきた。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し、高感度な増幅系が出来る mRNA の増幅系を利用した検査方法の作成をおこなった。

A-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

環境中に生息するレジオネラ菌およびその他の病原体を菌種レベル及び属レベル及び網羅的にスクリーニングする検出系の作成を目指した。スクリーニング法として マイクロアレイ法と realtime PCR 法の両方を作成し、多様な使用方法に適応できる環境を研究者に提供することを目的とする。

A-3) 抗原アレイの作成のためレジオネラ抗原抽出法の基礎的な検討

レジオネラ感染症患者、あるいは健康者の抗体レベルを測定するための抗原アレイを作成することを目標に、レジオネラの表面抗原を多種類、精製した。有望な抗原が決定されれば、尿中抗原の検出にかわる新しい抗原検出系の作成のための布石にもなる。

B. 研究方法

B-1) レジオネラの気道感染症を診断する mRNA の高感度検出方法

喀痰中の RNA を Guanidium 塩存在下で抽出し、逆転写酵素と T7promotor 付プライマー (5-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAG·xxxxxx) 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 で逆向きの RNA を大量に合成させる反応を採用した。

B-2) 水および土壌環境中のレジオネラ菌をはじめとする病原体のスクリーニング方法の作成

レジオネラ菌をはじめ、飲料水、シャワー水、風呂水などの汚染の原因になる病原体を網羅的にモニターする primer set を作成した。この目的のために浄水汚染が頻回にある Legionella 属、Mycobacterium 属、Cryptosporidium 属、Acanthamoeba, 人病原性カビ一般、細菌一般、および陽性コントロールを増幅する8種類の primer set を作成した。Legionella 属 および Mycobacterium 属が増幅された場合、さらに菌種を同定するための Legionella、Mycobacteria でそれぞれ40種類の probe が搭載された silicon マイクロアレイを作成した。

最初の Screening でこれらの2つの属に PCR 産物が得られた場合、CY3 標識の Primer で再度 PCR 産物を増幅し標識し、silicon array と 55C で2時間反応させた。標識産物を silicon microarray と反応させ菌種を同定する方法を採用した。

DNA/RNA の回収法は水の場合は濃縮操作が、土壌の場合は PCR を阻害する腐敗酸を取り除く作業が必要になる。水は milipore の遠心濃縮法を使った後に核酸を抽出した。菌体は Guanidium 塩の存在化で RNA を安定化させ、girconium beads で物理的に破碎したのち、古典的なフェノール抽出—エタノール沈殿法で精製した。この方法で回収した土壌の核酸は腐敗酸を大量に含んでいるので、silica でコートしたマグネットで核酸だけ吸着させ、腐敗酸を除いた。

われわれは2004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、両遺伝子を標的にした DNA マイクロアレイを作成した。マイクロアレイは5mm x 5mm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る。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。

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用にデザインした。一方、人病原性細菌 1010 菌種の菌種特性配列を搭載したマイクロアレイを作成した。細菌の16S rDNA の Universal primer で増幅した PCR 産物を CY3 で標識した Primer で再び PCR 産物を増幅させ、標識産物を ガラスアレイ上の oligoDNA と 55C で一夜反応させレーザーで spot を定量した。

B-3) 抗原アレイの作成のためレジオネラ抗原抽出法

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 hot phenol 法で精製した。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た plasmid を用いて無細胞系で大量の抗原の発現を試みた。

小麦麦芽の発現系を利用し promotor の機能を増幅させる omega 配列を付与したベクターを使用し、プラスミドの環状で発現させる方法と、制限酵素で切断後、線状プラスミドにして発現させる方法を比較した。

C 結果

C-1) レジオネラの気道感染症を診断する mRNA の高感度検出方法

mRNA を検出する方法は従来の PCR 法でリボソーム遺伝子を増幅する方法に比較して約100倍の感度が得られた。PCR 法で水 100ml あたり 5000 千個 (1ml 中約 50 個) に対して RNA では 100ml あたり 1 個の菌体が 16S rRNA 配列が検出出来る方法ができあがった。この方法で

は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。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、rRNA 検出法は感度の上昇につながる。

C-2) 水および土壌環境中のレジオネラ菌を含めた人病原体のスクリーニング法

多種類の病原体を一回の操作で検出できれば検査の効率が良い方法ができあがる。われわれは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、両遺伝子を標的にした DNA マイクロアレイを作成した。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る。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。

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。

C-3) 抗原アレイの作成のための抗原の精製

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, dnaj, liporotein, flaA, map, mip, dotB, および proA の 8 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試みた。LPS 抗原は 1 リッターの培養から 10-40 mg が回収され、実用化レベルの抗原が精製できる方法を確立した。

無細胞タンパク質発現系を用いたタンパク抗原の発現系では、合成した mRNA から *L. pneumophila* の 8 種類すべてについて十数 ug/250ul のタンパク抗原発現に成功した。また *L. pneumophila* serogroup 1-15 の菌株より LPS の大量抽出に成功した。本研究で構築したタンパク抗原の発現系は、*L. pneumophila* だけでなく他の細菌の抗原作製にも容易に応用可能な方法であり、極めて有用な系であると考えられた。本研究で作成あるいは抽出した大量の抗原の精製法で、今後プロテインチップやビーズアレイで患者の抗体価を多種類同時に計測する道が開けた。

D. 考察

D-1) レジオネラの気道感染症を診断する mRNA の高感度検出方法

使用したプライマーは 16S rRNA 配列を使用しており、レジオネラ属の多くの菌種を増幅することができる為、レジオネラ感染症診断に幅広く対応できる。細菌の rRNA は増殖が盛んな時は数千個コピーから一万コピーが合成されているとされており、rRNA 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。特に治療経過中の菌の消長の判断になると考えられる。DNA や尿中抗原が感染が収まった後にも長期間排泄されることから、mRNA の消失を治癒の指標に利用できると考えている。また水は消毒薬で殺菌した後も PCR 法のような DNA 検出法では陽性になるのでここでも利用価値が高まる。

D-2) 水および土壌環境中のレジオネラ菌を含めた人病原体のスクリーニング方法

風呂水、蒸留水の汚染の管理のために貯水する容器の定期的消毒と微生物検査は重要な環境管理方法である。レジオネラ菌の有無だけでなく一般細菌、特殊病原体の管理も必要になる。ところがこれらの病原体を網羅的に検索することは困難で我々は 2 つの方法論を作成した。一つは水に限定し 5 種類の重要な病原体の screening、カビと細菌の共通 primer を併用することで、予期しない病原体の混入をモニターする方法である。カビと細菌のそれぞれに共通の primer で増幅産物が

得られた場合、その微生物の特定のために 1010 種類の人、動物のレベル 3, 2 および日和見病原体が搭載されたマイクロアレイを使用すれば汚染のパターンを確認できる。Universal primer で増幅した産物をシーケンスすれば速やかに同定出来るが、環境水などはしばしば複数の菌の汚染を受けているので、PCR 産物は複合菌の産物が混じっており直接シーケンスする方法は成功しないことが多いのでマイクロアレイ法が威力を発揮できる。現在、この方法は大学発ベンチャーでキット化の計画が進行している。

浄水の検査では多種類の病原体を一回の操作で検出できれば検査の効率が良い方法ができあがる。臨床材料のような微量の検体から効率良く微生物を破碎し DNA/RNA を安定して抽出する方法を完成し、大学発ベンチャーで特許を申請し既にキットとして市販した。7 種類の Primer セットも大学発ベンチャーでキット化の計画が進行している。

D-3) 抗原アレイの作成のためのレジオネラ抗原抽出法の基礎的な検討

レジオネラの診断に有用な表面抗原あるいは分泌抗原の詳細は報告されていない。我々はレジオネラの血清方別に使用されている菌株の LPS 抗原と 8 種類の蛋白抗原を選択したが、これらの抗原が患者の血清で有効かどうか確認できていない。幸い全菌体を使ってレジオネラの抗体価を計測した台湾の研究者の協力を得て抗血清を入手できた。これらの血清を使わず Western blotting で有効な抗原の検索を行い、抗原を絞り込む予定でいる。最終的には蛍光ビーズに抗原及び抗体を固定して抗体の計測系、及び抗原の検出系を完成させる予定である。

E. 健康危険情報

該当無し

F. 研究発表

1. 論文

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.

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. 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

大楠清文. PCR 法を使った臨床微生物検査の導入時の障害と改善策. 感染症診療のコツと落とし穴 pp28-29, 中山書店, 2004

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

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.

2. 学会講演

Ezaki T. Regulation of level 3 pathogens and increasing roles of virulent attenuated strains. Symposium on Biosafety and role of culture collection. ICC-10, 2004, Oct. Tsukuba.

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.

江崎孝行

宇宙船内での感染症診断および船内菌叢のモニターシステムの開発. 宇宙開発事業団公開発表会、東京、2004.

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.

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

江崎孝行. 網羅的感染症診断システム、バイオ Japan, 横浜、2004.

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.

河村好章. DNA マイクロアレイを使った微生物の解析-検出・同定・発現-
第 77 回日本細菌学会総会 (シンポジウム)、大阪、2004.

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.

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.

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

三島徳子, 河村好章, 大楠清文, 江崎孝行. *Enterobacter* 属, *Klebsiella* 属, *Raoutella* 属, *Salmonella* 属, *Shigella* 属および *Eschrichia coli* の dnaJ 遺伝子のシーケンスと系統解析 第 24 回日本微生物系統分類研究会年次大会、伊東、2004.

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.

G. 知的財産所有権出願登録状況

- 1) 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)
- 2) Silicon array の検出方法 (特許申請準備中)
- 3) 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)

厚生労働科学研究研究費補助金

がん予防等健康科学総合研究事業

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年間のレジオネラ肺炎の臨床像

分担研究者 田口善夫（天理よろづ相談所病院呼吸器内科部長）

研究協力者 馬庭 厚，田中栄作，井上哲郎，櫻本 稔，水口正義，前田勇司，
寺田邦彦，谷澤公伸，後藤俊介，竹田知史，岡元昌樹，小松 方，島川宏一

研究要旨

京都大学医学部呼吸器内科及びその関連施設における過去5年間のレジオネラ肺炎の診療の現状について後方視的検討を行った。集計した29例のうち24例に対し診断目的で尿中抗原検査が用いられ、その感度は21例/24例(87.5%)であった。治療薬としては20例に対しキノロン系薬が用いられており、効果及び忍容性に問題は認めなかった。旧厚生省レジオネラ症研究班が1992年4月に診断・検査及び治療指針を作成してから10年以上経過し、この間でレジオネラ肺炎の診断及び治療方法は飛躍的に進歩しており、これら基礎データを元に新しい知見を含めた追加改訂作業が必要と考えられた。

A. 研究目的

レジオネラ肺炎は1977年に報告されて以降、欧米では市中肺炎、院内肺炎の原因として比較的頻度の高い疾患である。日本でもここ数年集団発生例の報告が増加し、死亡例も散見される。また旧厚生省研究班による診断・検査及び治療指針が発せられてから10年以上経過した現在、レジオネラ肺炎の臨床は当時と比較して飛躍的に進歩しており、現在の診療の現状に則した指針の改訂が必

要と考えられる。

B. 研究方法

京都大学医学部呼吸器内科及びその関連施設において1998年以降に診療したレジオネラ肺炎症例について、患者背景、診断方法、治療内容につきアンケート方式で調査を郵送で依頼し集計しレジオネラ肺炎の診療の現状についてまとめた。

(倫理面への配慮) 調査は各施設で院内倫理委員会の承認を得た後、可能なかぎり患者本人から同意を得て行った。すべての調査内容は臨床研究に関する倫理指針に基づき、情報伝達は分担研究者間と郵送で行い、結果集計に関わる業務を全て一括して分担研究者が行った。

C. 研究結果

1998年から2004年9月までの間にレジオネラ肺炎の症例数は合計29例であった。詳細は別表1に示す。性別は男性27例 女性2例で男性が圧倒的に多かった。平均年齢は58.86才であり一般市中肺炎よりやや若年の印象であった。全例が市中肺炎で院内肺炎は認めなかった。集団発生例は2例で他は全て散发例であった。基礎疾患を有する例が21例で、糖尿病9例、アルコール多飲5例、慢性呼吸器疾患4例の順に多かった(図1)。またこれとは別に危険因子とされている喫煙歴を有する症例は19例と多くに認められた。明らかな水系暴露歴を有する症例は17例であった(図2)。診断については尿中抗原検査を中心として行っている現状を示していると考えられた(図3)。治療方法については、マクロライドやリファンピシンを使用している症例よりもキノロン系抗菌薬の使用例が目立つ結果であった(図4)。転帰については死亡例が4例認められたが、

いずれも肺炎そのものが重症（基礎疾患が重症性も含めて）であったことが確認された。

D. 考察

今回のレジオネラ肺炎 29 例の臨床的背景をまとめると、男性で喫煙歴を有し糖尿病を初めとして易感染性の基礎疾患を有する患者が多い傾向を示したといえる。また発熱や咳嗽、喀痰といった一般的な肺炎の随伴症状以外に、神経筋症状や消化器症状を呈した症例が 13 例（44.8%）認められ、他の起炎菌による肺炎ではこういった随伴症状は少ないことから、実地臨床でレジオネラ肺炎を疑うきっかけになりうるものが改めて示された。

診断については尿中抗原によるものが最も多かった。今回の 29 例の中で尿中抗原検査を施行したのは 24 例でありその中で陽性は 21 例（感度 87.5%）で、やはり検査感度は高く有用性が改めて示された。また、尿中抗原検査の特異度は非常に高いことは文献的にも示されている¹⁾。ただ全てのレジオネラ肺炎を網羅的に診断するためには、現時点では検体処理を含め適切な時期に複数の検査を組み合わせるしかなく²⁾、実際の市中病院では困難である。しかしレジオネラ肺炎の原因菌種の多くが *L. pneumophila* serogroup 1 であり¹⁾その大半を尿中抗原検査で検出できることから、この検査の簡便性と迅速性と合わせ、従来の培養と血清反応中心の検査では診断しえなかった症例を相当数把握できるものと考えられる。平成 16 年度に健康保険適応が認められたこの検査の普及により、本邦におけるレジオネラ肺炎の新たな臨床像が今後明らかになる可能性があり期待したい。また、最近 PCR 法の発達により、さらに感度特異度とも優れた検査方法が研究開発されており、それらが今後臨床応用されてきた段階で評価が必要と考えられる^{3),4)}。

治療薬の選択についてはどの症例もマクロライドもしくはキノロン系薬を少なくとも 1 剤は使用していた。日本国内の市中肺炎ガイドラインでは重症例については初期治療にこのどちらかを使用（併用）することを推奨しており、レジオネラ肺炎の診療にも問題のないものである。文献的には海外では、最近特にキノロン系薬の強い抗菌力と副作用の認容性がいわれており⁹⁾、実際今回の 29 症例のうち 20 例において使用され、これはマクロライドよりも多かった（併用も含む）。1992 年旧厚生省班の治療指針にもキノロン系薬の記載があるが、細胞内移行性の問題と副作用の問題からさほど強くは推奨していない。しかし今回の 29 例だけでなく、実地臨床における現在のキノロン系薬の位置づけは、当時言われていたほど副作用の問題は実際には少ないというのが一般的であり、文献的にもエリスロマイシンよりも軽度とされ⁹⁾、今回の診断治療指針の改訂では盛り込むべきと考えられる。また 2003 年 12 月に初めて国内発売されたケトライド系薬については、既にレジオネラ肺炎に保険適応が認められている抗菌薬である。今回の調査でも 1 例使用例（治験段階で）が認められた。国内実地臨床の場における治療成績については、現時点ではさらに症例を増やして検討する必要があると考えられるが、海外では既にその有効性の高さは認められている⁹⁾。リファンピシンについては、マクロライドとの併用を従来から推奨しているが、最近併用することの利点が少ないとされており欧米のガイドライン（IDSA 2000 年）ではレジオネラ肺炎に対しては推奨されていない¹⁾。

今回の検討ではレジオネラ肺炎 29 例のうち 25 例は軽快、4 例が死亡した。死亡例のうち 2 例は発症から診断まで 7 日以上要したが、残り 2 例は早期診断されていた。診断に時間を要した死亡例でも重症肺炎として診断前からマクロライドやキノロンを使用しており、診断が遅れたので死亡したというよりは肺炎そのものが重症（基礎疾患の重症度も含めて）と考えられ、死亡例 4 例に共

通していると考えられた。

E. 結論

最近のレジオネラ肺炎の診療の現状について報告した。診断方法として最も重要な位置づけに尿中抗原検査，治療薬については同様にキノロン系薬を据えて診断・検査及び治療指針の改訂をする必要がある。

謝辞

この調査に全面的に御協力いただきました京都大学大学院医学研究科器官病態学講座三嶋理晃教授，ならびに症例調査に御協力いただきました西神戸医療センター呼吸器科，神戸市立西市民病院呼吸器内科，大阪赤十字病院呼吸器内科，北野病院呼吸器内科，京都大学呼吸器内科，小野市民病院呼吸器科，倉敷中央病院呼吸器内科，神戸市立中央市民病院呼吸器内科の諸先生方に深謝申し上げます。

文献

- ・厚生省レジオネラ肺炎診断基準と診断・検査及び治療指針 1992.4
- ・Barry S.F. et al: Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. Clinical microbiology reviews: 506-526 2002
- 1. Bartlett, J.G. et al: Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. Clin. Infect. Dis 31: 347-382 2000
- 2. J.W.Den Boer et al: Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 23: 871-878 2004
- 3. Herpers BL et al: Real-time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct

detection and differentiation of Legionella spp. And Legionella pneumophila. J Clin Microbiol 41: 4815-4816 2003

4. Khanna M. et al: The Pneumoplex Assays, a multiplex PCR-Enzyme hybridization assay that allows simultaneous detection of five organism, Mycoplasma pneumoniae, Legionella pneumophila, Legionella micdadei, and Bordetella pertussis, and its real-time counterpart. J Clin Microbiol. 43: 565-71 2005
5. Edelstein, P.H.: Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires' disease: time for a change. Ann Intern. Med. 129: 328-330 1998
6. Hammerschlag MR et al: Activity of telithromycin, a new ketolide antibacterial against atypical and intracellular respiratory tract pathogens. J Antimicrob Chemother. 48 Suppl T1 25-31 2001

F. 健康危険情報

省略

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 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

該当なし

別表 1-1

症例 No.	性別	年齢	基礎疾患	喫煙歴	随伴 症状		所要日数 (推定 日)		水系暴露		その他
					神経筋	消化器	発症-受診	受診-診断	温泉	スーパ-銭湯	
1	男	41	アルコール多飲	あり			4	2	○		
2	男	60	骨髄異形成症候群	あり	○		3	8		○	
3	男	67	慢性閉塞性肺疾患	あり		○下痢	4	3			自宅循環式風呂
4	男	56	糖尿病	あり			7	14		○	
5	女	56	なし	あり	○		3	1			自宅居酒屋厨房
6	女	67	気管支拡張症	あり			5	不明			
7	女	69	糖尿病	あり			3	1	○		
8	男	53	アルコール多飲	あり	○	○下痢	10	1			
9	男	42	なし	あり	○		4	1			
10	男	53	なし	あり			1	6			
11	男	53	高血圧	あり		○下痢	3	7			
12	男	57	なし	不明			7	6			
13	男	67	マクログロブリン血症	不明			3	2	○		
14	男	56	なし	不明		○下痢	15	9	○		
15	男	46	大動脈解離	あり			5	22	○		
16	男	78	なし	なし			7	8			加湿器
17	男	52	なし	不明	○		3	0			工場生産系
18	男	60	なし	不明	○		5	0			工場生産系
19	男	25	ネフローゼ症候群	不明			7	11			
20	男	59	糖尿病	不明			3	17	○		
21	男	55	関節リウマチ, 糖尿病	あり			2	1		○	
22	男	72	肺癌	あり	○	○	3	1			
23	男	70	アルコール多飲	あり	○		5	1			下水工事
24	男	87	脳梗塞	不明	○		4	7	○		
25	男	67	慢性閉塞性肺疾患	あり			4	1		○	
26	男	56	アルコール多飲, 糖尿病	あり			3	1		○	
27	男	53	糖尿病	あり			2	1			
28	男	58	アルコール多飲, 糖尿病	あり		食不	7	1			
29	男	72	慢性腎不全透析中	なし			8	5			腐葉土多量扱う

別表 1-2

症例 No.	発症 散発	形態 集団	診断方法 (注1)					尿中抗原	ELISA法	蛍光抗体法	その他	菌種
			分離培養法	染色法	PCR法							
1	○						○					
2	○						○				血清抗体価	
3	○		○				○				血清抗体価	<i>pneumophila</i> 1
4	○						×					
5	○						○					
6	○						○			○		
7	○						○					
8	○						○					
9	○						○					
10	○						○	○				
11	○		○	×			○					<i>pneumophila</i> 1
12	○		○				○					<i>pneumophila</i> 1
13	○		○				○					<i>pneumophila</i> 1
14	○		○				○					<i>pneumophila</i> 1
15	○					○						
16	○					○	×					
17		○					○					
18		○	○				○					<i>pneumophila</i> 1
19	○		○					○				<i>pneumophila</i> 1
20	○		○					○				<i>pneumophila</i> 6
21	○						○			×		
22	○		○				○			×		<i>pneumophila</i> 1
23	○		×				○			×		
24	○						○					
25	○		×				○			×		
26	○		○				○					<i>pneumophila</i> 1
27	○		○				○					<i>pneumophila</i> 1
28	○		×				○			×		
29	○		○			×	×				×DNA	<i>longbeachea</i>

別表 1-3

症例 No.	治療薬 (注2) マクロライド	キノロン	RFP	MINO	その他	転帰 軽快	死亡	
1	EM		○			○		(注1) 空欄 施行なし
2	CAM	CPFX600iv				○		○ 施行し陽性
3		CPFX600iv				○		× 施行し陰性
4	CAM					○		DNA DNA hybridization
5		CPFX600iv				○		(注2) 治療薬
6					ケトライド	○		EM erythromycin
7	EM		○			○		CAM clarithromycin
8	EM					○		AZM azithromycin
9	EM		○			○		CPFX ciprofloxacin
10	AZM			○		○		TFLX tosufloxacin
11	AZM	CPFX300iv				○		LVFX levofloxacin
12		CPFX600iv				○		RFP rifampicin
13		CPFX600iv					○	MINO minocycline
14		CPFX600iv				○		
15	AZM	TFLX600po				○		
16		CPFX300iv				○		
17		CPFX600iv				○		
18		CPFX600iv				○		
19	EM						○	
20	EM		○			○		
21		CPFX600iv				○		
22		CPFX600iv				○		
23		LVFX400po		○		○		
24		CPFX600iv					○	
25	EM	CPFX600iv					○	
26	EM	CPFX300iv				○		
27	EM	CPFX600iv				○		
28	EM	CPFX600iv				○		
29	EM	CPFX300iv				○		

図1 基礎疾患の内訳 N=29

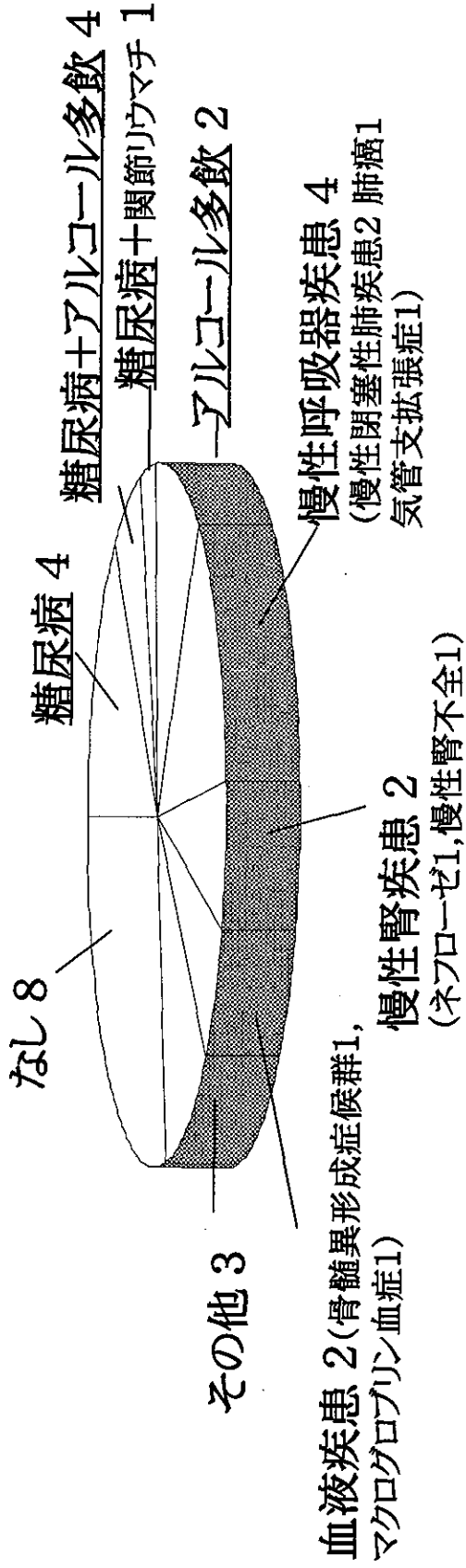


図2 水系暴露歴内訳 N=29

