

図1

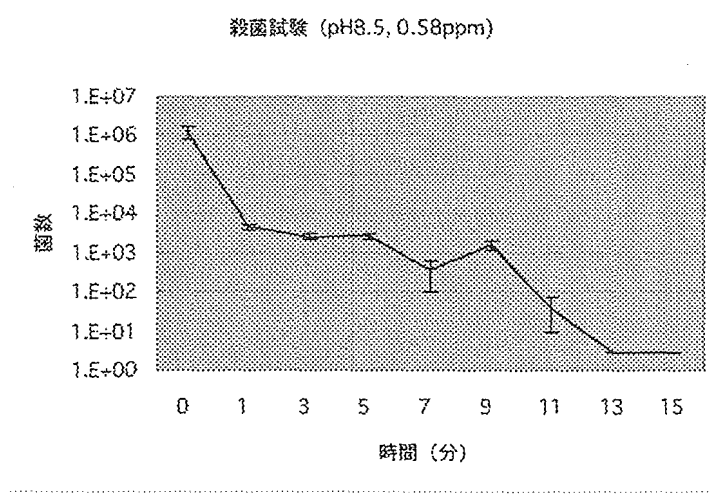
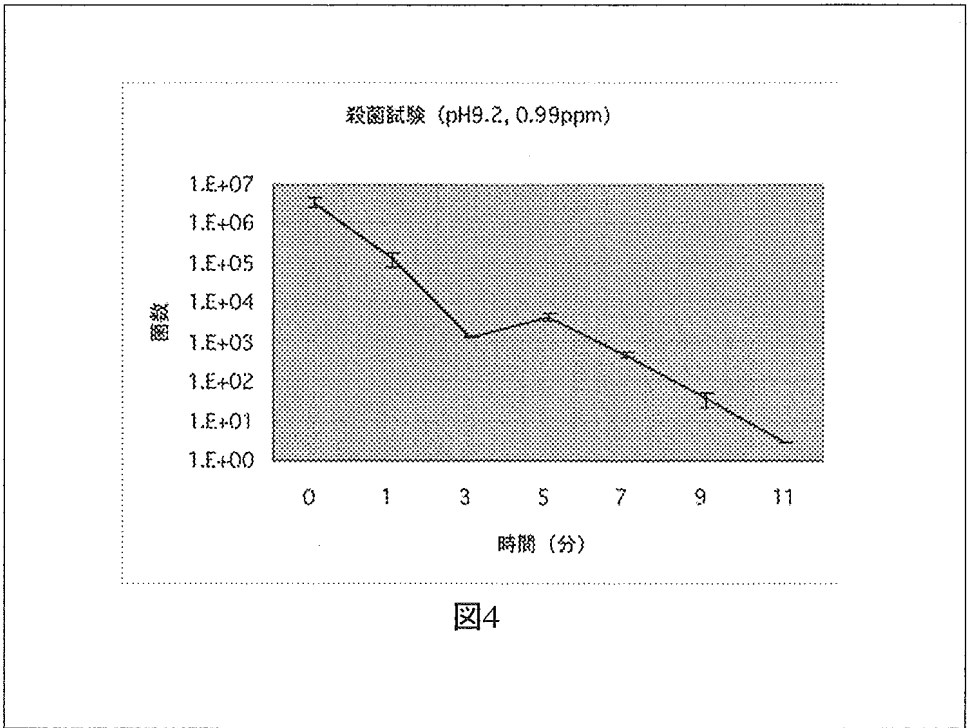
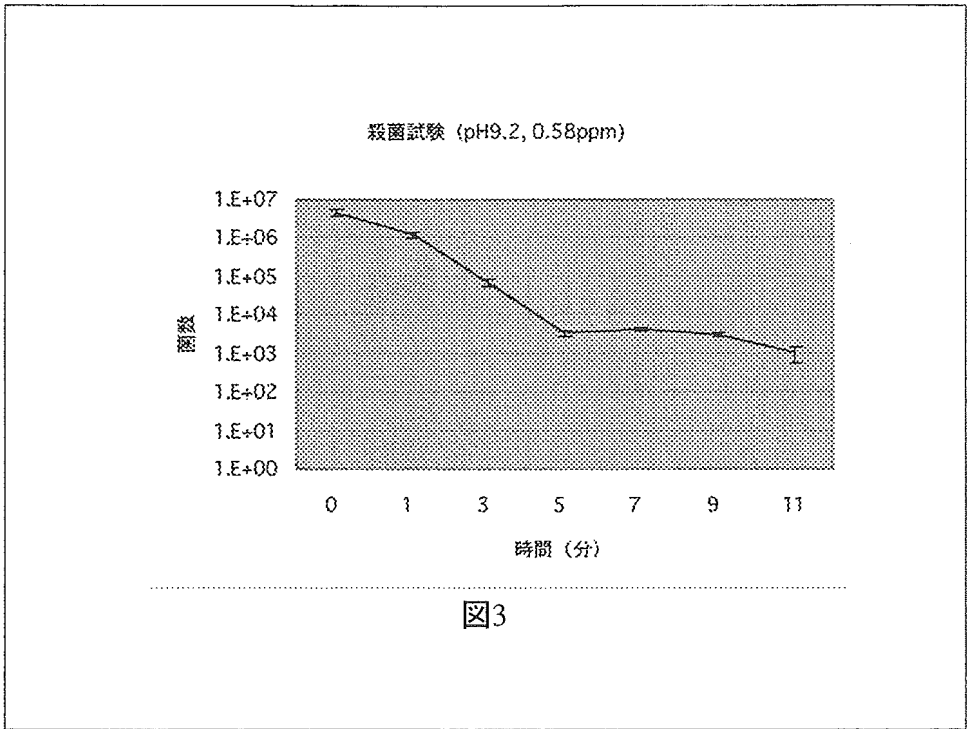
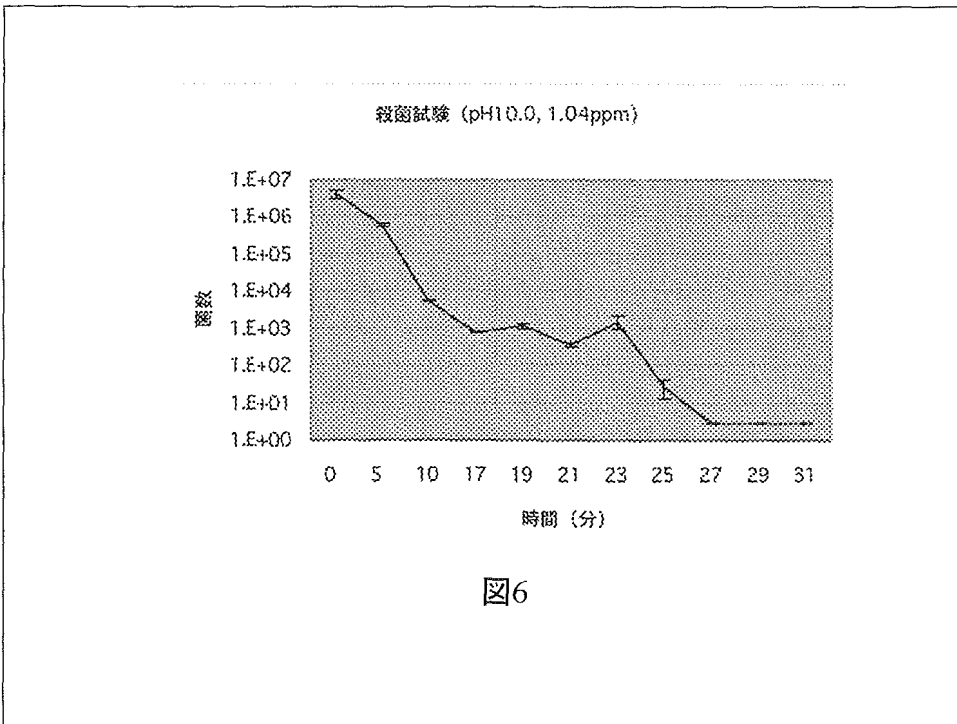
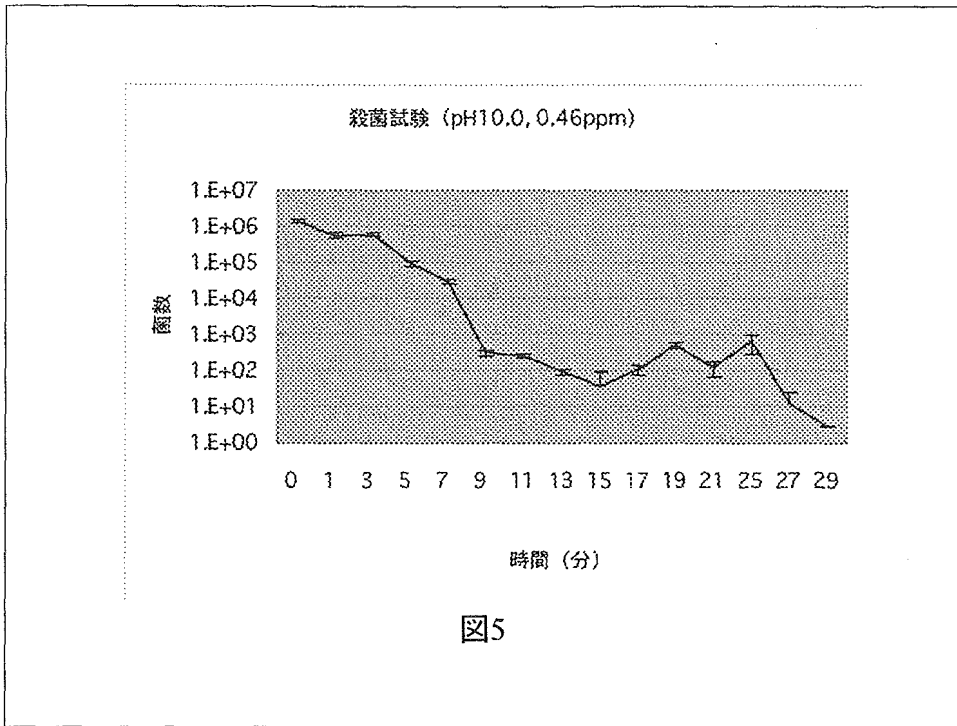
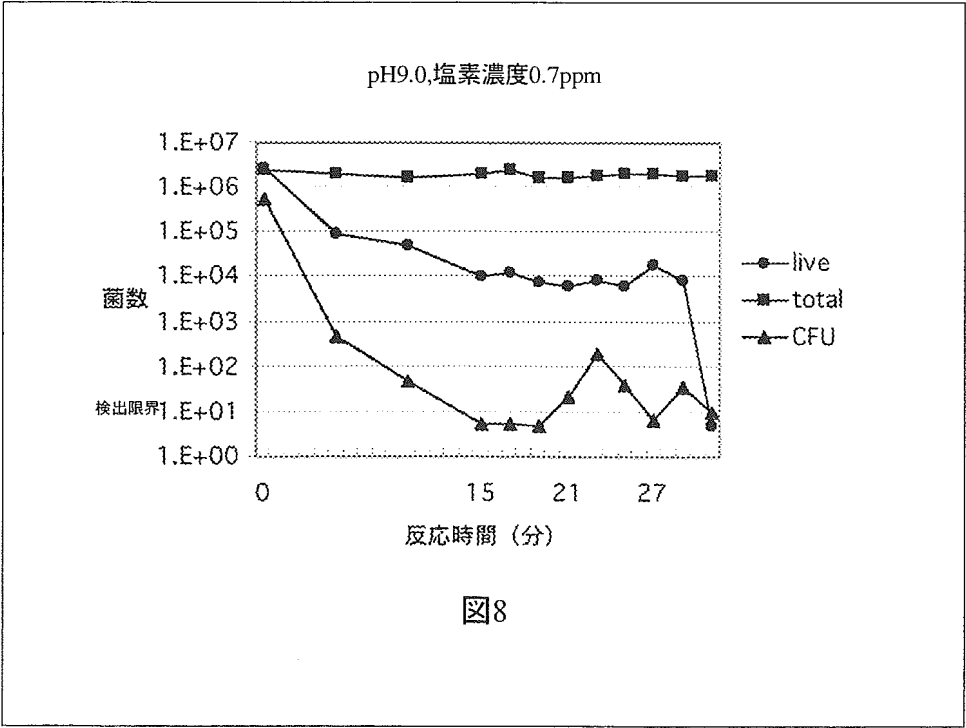
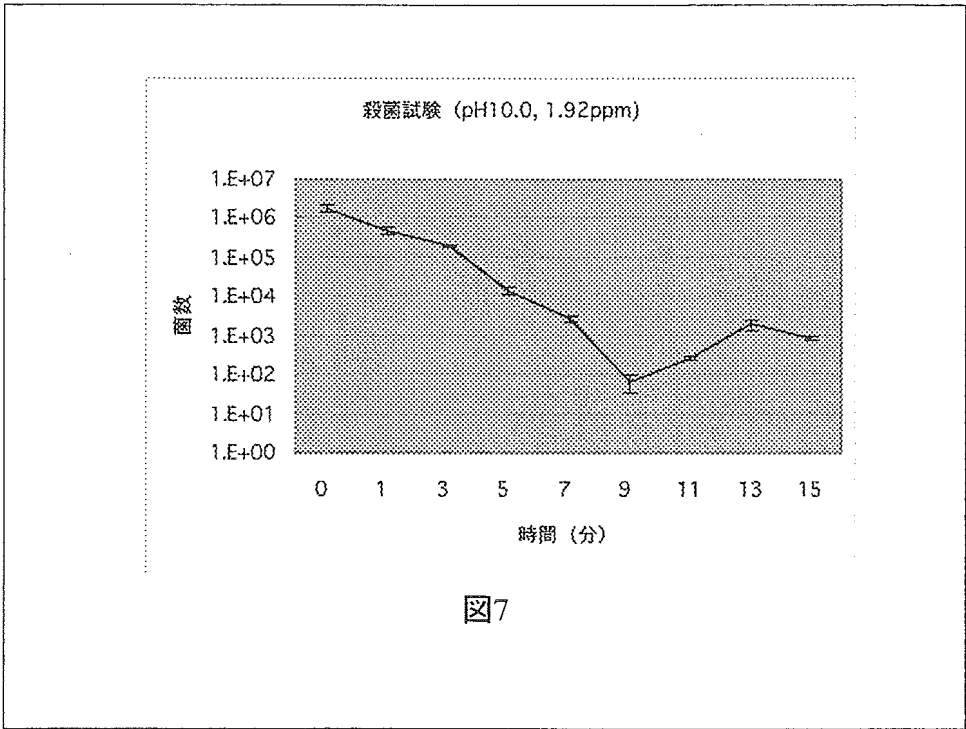


図2







レジオネラ新規病原因子の探索研究

分担研究者 三宅 正紀 静岡県立大学 薬学部 微生物学教室

研究要旨

一般に、病原細菌における様々な蛋白質の発現は菌の増殖相に依存して制御されていることが知られている。対数増殖後期における *Legionella pneumophila* は、ストレス耐性、細胞毒性、運動性、ファゴリソソーム形成阻害能などの病原性に関与する能力の上昇が見られ、*L. pneumophila* の病原性を制御する因子の発現調節が増殖相に依存してなされていると推察されている。本研究において、2D-DIGE (2 Dimensional Differential Image Gel Electrophoresis) 解析により、対数増殖期及び対数増殖後期の菌体蛋白質の発現量を比較解析し、菌の新規病原因子となりうる蛋白質を網羅的に探索した。

L. pneumophila の対数増殖期及び対数増殖後期で有意に発現量の差異が認められる菌体蛋白質を合計 106 個検出した。同定された蛋白質の約 8 割が対数増殖後期にて発現が増加しており、その中には解糖系、TCA 回路や脂質代謝に関連した酵素が多く含まれていた。*L. pneumophila* は本来糖の酸化や発酵を行わず、エネルギー源として主にアミノ酸を利用することが知られているが、今回の結果より、対数増殖後期ではアミノ酸の枯渇によって *L. pneumophila* がアミノ酸以外のものをエネルギー源として利用する可能性が推測される。このことは栄養が十分に供給されない感染宿主内で菌が宿主のエネルギー産生系を利用して生存、増殖する可能性を示唆するものであった。また、その他にストレス蛋白質、鞭毛構成蛋白質、twitching motility あるいは走化性に関連する蛋白質の発現上昇が見られ、これらは既知の病原因子との機能的関連が類推され、新規病原因子となりうる可能性が推察された。

A. 研究目的

L. pneumophila は、宿主細胞内で活発に増殖する過程 (replication form) と、新しい宿主細胞に感染する過程 (transmission form) で、それぞれにおいて必要な遺伝子・蛋白質の発現を巧みに調節することにより、その環境変化に適応すると考えられている。一方、人工培養液中における菌の増殖は、増殖が最も盛んな対数増殖期 (exponential phase) と、栄養素が消費されて代謝物が蓄積するために菌数が殆ど変化しなくなる定常期 (stationary phase) の二相に大きく分けられる。また、菌の増殖に必要な栄養が枯渇し始める対数増殖後期 (post-exponential phase) は、*L. pneumophila* の宿主細胞内における増殖後期 (宿主内からの脱出直前) の *in vitro* での擬似的環境として捉えることが可能とされている。この増殖相の *L. pneumophila* は、浸透圧及び熱ストレス耐性、細胞毒性、運動性、ファゴリソソーム形成阻害といった菌の病原性に関わる性状が強く現れることが明らかとなっている。これら対数増殖後期で認められる *L. pneumophila* の性質は、菌の宿主細胞における増殖後期での細胞内からの脱出時、放出される環境中での生存、及び新たな宿主への感染に深く関与していると考えられている。したがって、*L. pneumophila* の人工培養液中での対数増殖期、対数増殖後期を、それぞれ宿主内増殖における replication form 及び transmission form と捉えることは、*in vitro* 条件で *L. pneumophila* の病原性、

病原因子を考える有用な手段とされる。

これまでに様々な *L. pneumophila* の病原因子及びそれらによって形成される病原ネットワークに関して報告されてきたが、包括的に病原機構を説明されるには至っていない。しかしながら昨年、*L. pneumophila* ゲノムの全塩基配列が発表され、コードされる遺伝子、蛋白質及びそれらの推定される機能についての報告がなされたことから、レジオネラ研究においても、これらの情報を利用したポストゲノム解析が可能となった。

本研究では、2D-DIGE システムを用いて、対数増殖期及び対数増殖後期における *L. pneumophila* の全菌体蛋白質の発現量を比較解析し、発現変動の見られる蛋白質をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry; MALDI-TOF MS) 及びゲノムデータベースを駆使して同定することにより、新規病原因子となりうる蛋白質を網羅的に探索した。

B. 研究方法

1. 使用菌株及びその培養条件

L. pneumophila JR32 株を、CYE 平板培地上で好氣的条件下 37℃にて 3 日間、あるいは AYE 液体培地中で 37℃にて培養した。

2. 二次元電気泳動

2-1. DIGE 用試料の調整

L. pneumophila JR32 株を AYE 液体培地中 37℃にて、対数増殖期（菌培養液吸光度 $OD_{600}=1.6$ ）及び対数増殖後期（菌培養液吸光度 $OD_{600}=3.8$ ）まで培養した。各培養菌液を遠心集菌し、滅菌で洗浄後、各試料につき菌数が 7.5×10^9 cells となるように滅菌 PBS で希釈調整した。菌液試料に細胞溶解用緩衝液を加え蛋白質を可溶化後、超遠心により核酸を沈殿除去し、一晚透析した上清を試料溶液とした。

2-2. 標識反応

各蛋白質試料溶液をそれぞれ以下の Cy Dye を用いて、蛍光標識した；
対数増殖期試料： Cy3、対数増殖後期試料： Cy5、各試料の等量混合物： Cy2

2-3. 一次元目電気泳動

Immobiline DryStrip pH3-10NL, 24cm (Amersham) を使用して、Ettan IPGphor にて一次元電気泳動を行った。

2-4. 二次元目電気泳動及び画像解析

一次元目展開した DryStrip を二次元目電気泳動用ゲル上部のゲル面まで挿入し、二次元目電気泳動を行った。泳動終了後、泳動用ゲルを Typhoon 9400D (Amersham) でスキャンした。

スキャン後、DeCyder Differential Analysis Software を用いてディファレンシャル解析を行った。DIA (Differential in-gel Analysis) にて蛋白質スポットの検出及び数値化を、BVA (Biological Variation Analysis) にて群間での蛋白質スポットのマッチング及び発現差異についての統計解析を行い、対数増殖期あるいは対数増殖後期の間で ± 1.5 倍以上の差異が認められた蛋白質スポットを選別した。

3. 蛋白質の同定

3-1. 蛋白質スポットの切り出し

選別した蛋白質スポットについて Ettan Spot Picker (Amersham) を用いて pick を行った。

3-2. In-Gel Digestion

回収したゲルをチップに移し、ピペットマンにチップを装着して、トリプシンによる蛋白質のゲル内消化を行った。酵素消化により得られたペプチドを抽出し、抽出溶液を Zip Tip u-C18 (Millipore) を用いて脱塩・濃縮した。

3-3. 同定

MALDI-TOF MS (ultraflex、Bruker) を用いて質量分析を行った。PMF (peptide mass fingerprinting) 法により得られた MS データを Mascot search によりデータベース (NCBIInr) 検索し、蛋白質の同定を行った。また、タンデム質量分析 (MS/MS) を行い得られたペプチド配列タグと PMF 法から得られた MS データを結合させ、同様に検索をかけることにより、同定結果を確実化した。

C. 研究結果

2D-DIGE 解析システムにより、*L. pneumophila* JR32 株の対数増殖期及び対数増殖後期で発現量に差異が認められる菌体蛋白質を検出した。ゲルイメージの解析には DeCyder Differential Analysis Software を利用し、蛋白質スポットの検出、ゲル間のスポットマッチング、スポット強度の定量化と標準化、及び Student's t-test による有意差検定を行った。その結果、各ゲル平均 2145 個の蛋白質スポットを検出し、また同時に流した 3 枚のゲルの標準ゲルに対するマッチング数は平均 1399 個であった。そのうち Student's t-test で $t < 0.05$ かつ Ratio (対数増殖期に発現した蛋白質スポットの蛍光強度に対する対数増殖後期に発現した蛋白質スポットの蛍光強度比の絶対値) ≥ 1.5 を満たし、対数増殖期と対数増殖後期で有意に蛋白質の量的変動が認められたスポット合計 104 個を検出した (対数増殖後期で発現増加が認められたスポット 88 個; 減少したスポットが 16 個)。それらスポットについて、MALDI-TOF MS により質量分析を行い、得られた MS データと MS/MS により得られたペプチド配列タグを元にデータベース検索 (NCBIInr) を行い、蛋白質スポット合計 80 個を同定した。

D. 考察

L. pneumophila JR32 株の対数増殖期及び対数増殖後期で発現量に差異が認められる 80 種類の蛋白質を同定した。発現量の変動した蛋白質について機能別に分類すると、多くが代謝系に関与する酵素であった。また同定蛋白質の約 8 割が対数増殖後期にて発現の増加が見られ、その中には糖質や脂質又はアミノ酸の代謝酵素が多く含まれていた。

糖質代謝に関与する酵素のうち、ピルビン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素は解糖系で働く酵素であり、各々対数増殖後期にて 1.92 倍、3.71 倍増加していた。しかしながら、ピルビン酸脱水素酵素複合体の構成因子 AceE は対数増殖後期にて逆に 1.53 倍減少していた。また、リンゴ酸脱水素酵素は TCA 回路中で利用される酵素であり、6.49 倍増加していた。また、リパーゼ及びアセト酢酸脱水素酵素のように、脂質代謝に関与する酵素も各々 6.1 倍、7.05 倍増加していた。これまでの研究から、*L. pneumophila* は対数増殖期から対数増殖後期へ移行する際、緊縮応答 (stringent response) 様の調節を起こすことが報告されている。緊縮応答時には、低分子量情報伝達物質である ppGpp (グアノシン 4 リン酸) が菌体内に蓄積し、増加した ppGpp は、遺伝子発現調節メディエーターとして RNA ポリメラーゼの活性を制御する。現在までに *rel*、*rpoS* 等の緊縮応答に関与する遺伝子が多数同定されており、またそれらは多くの細菌で高い相同性を持つことが知られ、*L. pneumophila* においても、関連する遺伝子と相同性を持つ遺伝子が同定されている。*L. pneumophila* は *in vitro* 培養液中のアミノ酸が枯渇すると、RelA を介して ppGpp を菌体内に蓄積させ、増加した ppGpp がシグマ因子である RpoS 及び FliA、2 成分制御系を構成する転写調節因子である LetA/S を活性化する。LetA/S は、菌の transmission form に由来する性状のレプレッサーとして機能し、また宿主内増殖のアクチベーターである CsrA を抑

制することで菌の宿主細胞内での増殖を抑制し、RpoS や FliA と一部協調して、または独立的に、菌の宿主細胞からの脱出、新たな宿主への感染あるいは環境変化への適応などに必要となる性質を発現させると考えられている。そのため、栄養が豊富な対数増殖期では殆ど見られなかった浸透圧及び熱ストレス耐性、細胞毒性、運動性、ファゴリソソーム形成阻害といった菌の感染性及び環境変化への対応に必要な性質が、栄養の枯渇する対数増殖後期において認められるようになると考えられている。*in vitro* 培養における対数増殖後期及び感染細胞内における増殖後期では、共に菌が利用できる栄養が枯渇してくる環境であり、また宿主細胞内以外の自然環境中も決して栄養が豊富な環境ではなく、いわゆる飢餓状態に似た環境であると考えられる。これらの事実を考え合わせると、本研究における糖質代謝及び脂質代謝に関与する酵素の合成が対数増殖後期において増加するという結果は、栄養の枯渇により *L. pneumophila* が *in vitro* 培養初期の栄養豊富な条件で使うアミノ酸代謝経路以外に、糖・脂質を代謝することによりエネルギーを産生する経路を活性化することを示唆するものと推察する。*L. pneumophila* は本来糖の酸化や発酵を行わず、炭素源及びエネルギー源として主にアミノ酸を利用することが知られており、解糖系、TCA 回路、脂質代謝に関連した酵素が発現することは一見矛盾しているようである。しかしながら、*L. pneumophila* がこれらの酵素をコードする遺伝子を保有していることが明らかとなった全ゲノム公開時に、*L. pneumophila* が TCA 回路や糖質代謝に関与する酵素を宿主細胞内環境中で利用する可能性が既に示唆されており、本研究で得た結果は、この推察を支持するものとなるのかもしれない。リパーゼ、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素及びアセト酢酸脱水素酵素はケトン体合成時に、アデノシルホモシステイナーゼ、リンゴ酸脱水素酵素は糖新生時に利用される酵素であるが、糖新生及びケトン体生成は一般的に飢餓時に見られる現象であり、これらの酵素の発現が上昇した理由も上記のように考えると理解できる。*L. pneumophila* は様々な環境に適応できるように、環境に応じて利用する酵素やエネルギー産生系を調節していることが推察される。

対数増殖後期にて 2.65 倍の増加が認められたグリシンペタインアルデヒド脱水素酵素は、グリシンペタインの合成酵素である。グリシンペタインは多くの原核生物及び真核生物において細胞の浸透圧調節物質として利用されており、*Bacillus subtilis* では菌体内にグリシンペタインを蓄積させることにより浸透圧ストレスに耐性を示すことが報告されている。また、ストレス蛋白質 ClpB や、Heat shock protein 90 HtpG、及び GspA (Global stress protein A) も対数増殖後期にて増加が認められ、特に GspA は 9.12 倍と高い発現量の増加が認められた。GspA は *L. pneumophila* のマクロファージ感染時、及び *in vitro* での熱、活性酸素、酸など様々なストレス条件下において発現誘導されることが知られている。よって、これら対数増殖後期にて発現量が増加した蛋白質は、環境変化による様々なストレスに対応するために必要であることが推測される。*in vitro* 培養において対数増殖後期から定常期では、菌の代謝産物が増加し始め、それらの蓄積による自身への毒性に対する耐性にもストレス蛋白質は有効に機能すると考えられる。

Icm/Dot Type IV 分泌装置によって宿主内へ送達されるエフェクター Sid (substrate of Icm/Dot transpoter) ファミリーに属する SidE は、対数増殖後期にて発現量の減少が認められた一方、そのパラログ SdeA, C は増加する結果が得られた。Sid ファミリー蛋白質に関して、SidC および Sde は、*in vitro* 培養における対数増殖後期にて発現が誘導されることが既に報告されている。また、これまでに同定されてきた他のエフェクター LidA、RalF も対数増殖後期にて発現量が増加することが知られており、SidE の発現量が対数増殖後期にて減少するという今回の結果は興味深い。全てのエフェクターが対数増殖後期で発現が誘導されるとは限らず、SidE の発現量の減少が、他のエフェクターや Sid ファミリー蛋白質の発現あるいは機能に何らかの影響を及ぼしているのかもしれない。

菌の運動性を司る鞭毛のモータースイッチ蛋白質である FliG は対数増殖期において、3.69 倍の増加が

認められた。FliG は鞭毛モーターのスイッチや回転に関与する蛋白質であり、*Salmonella typhimurium* では鞭毛の構築、回転、スイッチに必須であることが報告されている。*L. pneumophila* においては、対数増殖後期で鞭毛構成蛋白質の一つ FlaA の発現が上昇することや、レジオネラアレイを使った遺伝子発現解析において、対数増殖後期で様々な鞭毛関連遺伝子の発現上昇が見られること（三宅等、第75回日本細菌学会総会、横浜）から、鞭毛運動に必須である FliG の発現量が増加したことは、これらの報告・データと矛盾しないものであった。

Type IV 線毛 (Tfp) の構成蛋白質である PilT は、対数増殖後期にて 6.62 倍の増加が認められた。Tfp は細菌の運動性、バイオフィーム形成、形質転換能、宿主への接着に関与し、様々な機能を持つことが知られている。また PilT は細菌の線毛による運動 twitching motility に関与することが報告されており、この蛋白質発現の上昇も、対数増殖後期における菌の運動性の上昇を支持するものと考えられる。一方で、Tfp 生合成装置は Type II 分泌装置と相同性があり、PilT を含む多くの構成因子がヌクレオチド-3-リン酸 (NTP) 加水分解酵素 (NTPase) 活性を有することが知られている。また、近年 *L. pneumophila* のタイプIV分泌装置構成蛋白質 DotB は PilT と相同性を有しているという報告がなされた。内膜に局在する DotB は、菌の細胞内増殖に必須なエフェクター分子の分泌を行う際、細胞質への輸送に必要なエネルギー産生を触媒する ATPase 活性を示し、菌の細胞内増殖に不可欠であることが報告されている。このことから、対数増殖後期にて発現誘導した PilT が菌の細胞内増殖にも関与し、増殖性を制御している可能性が推察される。

その他 hypothetical protein として同定されたものが 10 スポット以上存在した。その中には、今回同定された蛋白質中対数増殖後期で最も著しい発現量の増大を示したものも含まれ、それらの生物学的機能、菌の病原性との関連は興味深い。

今回の解析においては、極端に分子量の大きいものや pH が酸性あるいは塩基性に偏った分子など、一定の実験条件における検出限界から解析が不可能であったものもあり、菌体全ての蛋白質の発現変動を解析できたとは言い難い。しかしながら、同定された蛋白質の多くがそれぞれ環境の変化に即した菌の応答を類推させるものであった。また、上述したように対数増殖後期にて発現上昇が見られたストレス蛋白質、鞭毛構成蛋白質、twitching motility あるいは走化性に関連する蛋白質は既知の病原因子との機能的関連が類推されることから、*L. pneumophila* の新規病原因子となりうる可能性が推察された。

L. pneumophila の全ゲノム配列が公開されたことにより、今後本研究をはじめとするゲノムスケールのプロテオーム解析あるいは、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析など包括的な解析研究が進むと思われる。このような研究は、近年癌をはじめとする疾病の原因解明、創薬ターゲットの探索、あるいは疾病の早期診断や進行状況のモニターを可能とする疾病マーカー蛋白質の同定等に頻繁に利用されている。今後、レジオネラ研究においても、これらの技術を利用することで、病原メカニズムの解明、治療薬に関する創薬ターゲットの探索、ワクチン開発等の研究に新たな展開が生まれると考える。

E. 結論

L. pneumophila の対数増殖期及び対数増殖後期で有意に発現量の差異が認められる蛋白質スポット合計 104 個を検出し、そのうち 80 個について蛋白質の同定に成功した。同定した蛋白質の約 8 割が対数増殖後期にて増加しており、糖新生、ケトン体生成に関連した酵素が多く含まれていた。このことは、菌の対数増殖後期において栄養の枯渇してくる生存環境が、利用できる栄養が限られた宿主内に類似した環境であるとすると、栄養が豊富な *in vitro* 培養でアミノ酸のみを代謝する *L. pneumophila* が、宿主内環境では糖や脂質を利用する可能性を示した。その他、対数増殖後期にてストレス蛋白質、鞭毛構

成蛋白質、twitching motility あるいは走化性に関連する蛋白質の増加が見られた。これらの蛋白質は菌の運動性及び宿主細胞死に関連する事が考えられ、感染制御因子として機能していることが推察された。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyake M., Watanabe T., Koike H., Molmeret M., Imai Y., Abu Kwaik Y. Characterization of *Legionella pneumophila pmiA*, an gene essential for infectivity of protozoa and macrophages. (2005) Infect. Immun. 73: 6772-6282.
2. Miyake M., Fukui F., Imai Y. Differences in protein synthesis between wild type and intracellular growth-deficient strains of *Legionella pneumophila* in U937 and *Acanthamoeba polyphaga*. (2006) Microb. Pathog. (in press)

2. 学会発表

- 1.三宅正紀、原田俊彦、今井康之
レジオネラのマクロファージ感染初期における NADPH オキシダーゼ産生活性酸素種による殺菌からの回避について
第 125 回日本薬学会総会（東京）、要旨集 3 p.87、平成 17 年 3 月 30 日
- 2.三宅正紀、原田俊彦、今井康之
レジオネラ感染による食細胞 NADPHオキシダーゼ産生活性酸素種の産生抑制
第78回日本細菌学会総会（東京）、抄録 p.100、平成17年4月4, 5日
- 3.菅谷則子、今井康之、三宅正紀
リピドラフトを介した *Legionella pneumophila* のマクロファージ感染について
第78回日本細菌学会総会（東京）、抄録 p.102、平成17年4月4日
- 4.小池仁美、今井康之、三宅正紀
*Legionella pneumophila*新規細胞内増殖制御因子PmiAの機能解析
第78回日本細菌学会総会（東京）、抄録 p.102、平成17年4月4, 5日
- 5.Masaki Miyake, Takurou Watanabe, Hitomi Koike, Maëlle Molmeret, Yasuyuki Imai, Yousef Abu Kwaik.
Identification and characterization of *Legionella pneumophila pmiA*, a locus involved in infectivity of protozoa and macrophages.
6th International Conference of Legionella (Chicago)
Program and Abstracts Book p.28, October 17, 2005
- 6.三宅正紀、今井康之
*Legionella pneumophila*新規細胞内増殖制御因子の同定及び機能解析
中部乳酸菌研究会（甲府）平成17年11月25日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

レジオネラに対する抗体計測法の作成に関する研究

分担研究者 江崎 孝行

研究要旨

L. pneumophila の血清型 1 から6までの標準株のLPS抗原を精製し、6種類の異なった蛍光ビーズに固定し、一回の検査で6種類の抗体を計測できるマルチプレックス蛍光ビーズアレイ法を作成した。

A. 研究目的

レジオネラ感染症を起こす *L. pneumophila* の抗体価を計測する方法が血清型の1しかないため、2-6型の的確な診断を行うことが困難であった。そこで血清型1-6型までを一括して計測する方法を作成する必要がある、蛍光ビーズアレイ法を採用して1-6型を同時に測定する方法を作成することを目指した。

B. 研究方法

1) レジオネラ抗原の調整：レジオネラの血清型を識別している抗原は Lipopolysaccharide(LPS)であるので、*L. pneumophila* の6種類の血清型のLPS抗原を精製した。LPSの調製は、Hot phenol法を改変して行った。菌体を水15mlに懸濁後、同量の90%フェノールを加えて70℃、15分間攪拌した。これを氷上にて15分放置した後、遠心（10000×g、10分、4℃）した。水層を除去後、さらに水15mlを加えて抽出操作を繰り返した。再度遠心（10000×g、10分、4℃）後にフェノール層を分取した。分取したフェノール層にアセトンフェノールの9倍量加え、氷上にて15分放置後に遠心（3000rpm、10分、4℃）し、得られた沈殿を水に懸濁し、Proteinaseで蛋白を除去した後、水で透析した。透析した水溶液を遠心（3000rpm、10分、4℃）し、得られた上清を凍結乾燥した。凍結乾燥にて得られた結晶をLPSとして実験に供した。

2) 蛍光ビーズへの抗原の固定：蛍光ビーズとして市販の Luminex beads を使用した。抗体の測定は市販のウサギ抗血清を使用して評価した。人血清は、台湾のCDC協力を得てレジオネラ抗体の計測用に集められた患者血清の抗体価を測定し、測定系の評価を行なった。患者血清は台湾感染症センター（CDC）がレジオネラの感染症を疑う患者の血清を収集し、確定診断を行なう方法を確立するために保存していた血清を使用した。われわれが開発した方法の評価を共同研究として実施することにCDCが同意して入手したものである。

C. 研究結果

6種類の蛍光抗原ビーズを混合し、一度で6種類の抗原に対する抗体の計測方法を検討した。ウサギ抗血清の濃度依存的に交叉反応の増大が認められたが、500倍以上の希釈段階を使用することでこの問題は解決された。台湾の *Legionella* 感染患者の血清43検体について bead array にて測定した。検体は、500倍希釈して測定に供した。同試料はELISA法（capture antigenはSG1の全菌体タンパク）によって抗体価が測定されているものを使用した。台湾の患者43血清の血清型の分布を multiplex beads array 法で集計した。その結果、SG1(血清型1)の全菌体たんぱく抗原 ELISAでレジオネラ抗体陽性と判定された血清は、血清型6(SG6)が40%を占め、ついで4型(28%)で血清型1は17%に過ぎなかった。

D. 考察

6種類の血清型が容易に識別できる方法論を作成した。この方法を使用して測定した血清43検体の血清型の分布から台湾では6型が多いことが判明した。わが国では分離菌株の血清型のタイプはウサ

ギの型別抗血清が市販されているので、分離菌株の情報から1型が多いとされてきた。本件研究では6型が最も多く従来、わが国で蓄積されてきた分離株からの推測例のデータと異なっていた。わが国では患者の血液中の抗体価の分布に対する報告はないので、6種類の抗体を同時に計測できる方法を確立したことは新たな知見を得るきっかけを提供したと考えている。

E. 結論

L. pneumophila の6種類の血清型に対する抗体価をルミネックス蛍光ビーズで計測する方を確立した。レジオネラLPS抗原は安定なので蛍光抗原ビーズとして長期保存ができるため、抗体測定系として安定した供給体制が構築できると見込んでいる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

書籍

Yabuuchi E and Ezaki T. The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon proteobacteria. Garrity G, ed Bergey's Manual of Systematic Microbiology, Springer New York 2005

雑誌

Amano M. Et.al. Quantitative Microarray-Based DNA-DNA hybridization assay for measuring genetic distances among bacterial species and its application to the identification of family Enterobacteriaceae Microbiol. Immunol 49 (3) 255-263 2005

大楠清文、他 特定菌検出—ウイルス 検査と技術 33巻11号 1218-1222 2005

大楠清文, 江崎孝行 新しい遺伝子検査法NASBA法 Medical Technology 33 894-896 2005

Niwa T. et. al. Lytic enzyme, labiase for a broad range of Gram-positive bacteria and its application to analyze functional DNA/RNA J. Microbiol. Methods 61 251-260 2005

江崎孝行, 大楠清文 外来で利用可能なSTDの網羅的遺伝子診断法を求めて 外来で利用可能なSTDの網羅的遺伝子診断法を求めて 18巻 798-804 2005

大楠清文, 河村好章, 江崎孝行 新しい感染症検査法の発展と動向: ゲノムベースの細菌検査の基礎化学療法の領域 21巻 301-310 2005

H. 知的財産そのほか

該当なし

平成 17 年度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

レジオネラ肺炎診療の現状に関する研究

レジオネラ肺炎診療の現状と今後の課題について

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，田中榮作，井上哲郎，櫻本 稔，水口正義，前田勇司谷澤公伸，竹田知史，
岡元昌樹，小松 方，

研究要旨

レジオネラ肺炎の診療の現状と今後の課題について、われわれが行ってきた実地臨床研究に文献的な考察を加えて検討した。本疾病は本邦の市中肺炎のなかでは欧米と比較し必ずしも発生頻度は高いとはいえないが、1999 年のいわゆる感染症新法施行と集団発生事例報告の増加と社会問題化などにより、疾患の認知度が高まった。また診断については迅速性に優れた尿中抗原検査が、治療については奏効性や安全性の面でキノロン系薬の普及が覗えた。今後は、可能ならば自治体への実際の報告症例の情報開示を可能にするなど疫学的検討機会の拡大と、実地臨床における特異的診断方法の更なる普及により重症例以外の症例も把握することで、本邦におけるレジオネラ肺炎の現状と今後の展開が更に検討可能になると考えられた。

A. 研究目的

本邦におけるレジオネラ肺炎の臨床の現状をまとめ、問題点と今後の課題を模索検討する。

B-1. 研究方法

市中肺炎におけるレジオネラ肺炎の臨床の現状を検討するために、天理よろづ相談所病院にて 2004 年 5 月から 2005 年 8 月までに 92 例の市中肺炎症例について原因微生物の前向き検討をおこなった。また、最近の本邦及び海外におけるレジオネラ肺炎の動向を併せて文献的にも検討した。

（倫理面への配慮）研究は院内のみで行い、患者同意を事前に得て行った。なお情報伝達管理は一括して分担研究者が行い、結果集計に関わる業務も一括して分担研究者が行った。

B-2. 研究内容

A 当院での市中肺炎の原因微生物の前向き検討—レジオネラ肺炎の市中肺炎における頻度の検証
2004 年 5 月から 2005 年 8 月までに当院で診断した市中肺炎 92 例の原因微生物を prospective に検討した。市中肺炎診断時に文書による同意取得を行い以下の項目について検査を行った。

検査項目 市中肺炎治療開始日を Day1 として

（Day1-3）：喀痰培養（一般細菌、真菌）、血液培養および胸水培養（症例に応じて）、喀痰抗酸菌塗抹および培養

血液検査：寒冷凝集反応、マイコプラズマ抗体（CF）、C.pneumoniae IgG および IgA（ELISA）、

オーム病抗体 (CF)、尿中レジオネラ抗原 (immunochromatographic membrane assay) 尿中肺炎球菌抗原 (同)、レジオネラ血清抗体価 (マイクロプレート凝集反応)

(Day7-14) : 血液検査 : 寒冷凝集反応、マイコプラズマ抗体 (CF)、*C.pneumoniae* IgG および IgA (ELISA)、オーム病抗体 (CF)、尿中レジオネラ抗原 (immunochromatographic membrane assay) 尿中肺炎球菌抗原 (同)、レジオネラ血清抗体価 (マイクロプレート凝集反応)

(Day21-28) : *C.pneumoniae* IgG および IgA (ELISA)、オーム病抗体 (CF)、レジオネラ血清抗体価 (マイクロプレート凝集反応)

上記の各検査にて、診断基準を満たすものを起炎性ありと診断し検討した。

C. 研究結果

C-1 当院での市中肺炎の原因微生物の頻度の検証 92 例の検討

男性 62 例、女性 30 例 平均年齢 67.2 歳 (16-87 歳)、

外来治療 29 例、入院治療 61 例、外来治療から入院治療へ移行 2 例

米国感染症学会 (IDSA) ガイドラインにおいて重症度の検討

軽症例 (重症度分類 I,II) 31 例

中等症例 (同 III) 30 例

重症例 (同 IV,V) 31 例

原因微生物 (混合感染を含む)

S.pneumoniae 26 例 (28.3%)

H.influenzae 16 例 (17.4%)

C.pneumoniae 9 例 (9.8%)

M.pneumoniae 2 例 (2.2%)

Ps.aeruginosa 2 例 (2.2%)

M.catarrhalis 2 例 (2.2%)

C.psittaci 2 例 (2.2%)

L.pneumophila SG1 1 例 (1%)

K.pneumoniae 1 例 (1%)

MSSA 1 例 (1%)

E.coli 1 例 (1%)

A.fumigatus 1 例 (1%)

以上 原因判明 55 例 (59.8%) うち混合感染 11 例

不明 37 例 (40.2%)

レジオネラ肺炎は 92 例中 1 例のみであった。尿中抗原検査で迅速診断しえた重症肺炎であった。

C-2 本邦および海外における最近のレジオネラ肺炎の動向

市中肺炎に占めるレジオネラ肺炎の頻度について最近の本邦および海外での文献的報告につき検討した。

本邦においては、既知の報告では市中肺炎全体の1.5-3.9%との報告である¹⁾⁻³⁾。これらは規模の大きな基幹病院および大学病院が中心となり各々200-500例の市中肺炎を検討したデータである。また日本呼吸器学会成人市中肺炎のガイドラインには、診療所での市中肺炎の原因微生物の頻度の一例が記されているが、そこにおいてもレジオネラ肺炎の頻度は0.6%である。感染症新法の改訂と尿中抗原検査の普及により以前より報告症例数は増加しているが、後述する欧米と比べ実際の頻度はいまだ低いと考えられる。また本邦においても集団発生の報告が近年増加している^{4),5)}。特に入浴施設における報告が多く、厚生労働省、都道府県自治体において、これら報告に基づきサーベイランス事業と公衆衛生事業の推進がなされているのが現状である。

海外において市中肺炎におけるレジオネラ肺炎の頻度は、英国においては2.6-4.9%⁶⁾ (ICU入室重症肺炎に限れば12-24%)、カナダで2%⁷⁾、米国では外来診療可能な症例からICU入室を要する症例まで段階別に検討しているが、全体では3-14%と報告されている^{8),9)}。

いずれの報告でも重症になればレジオネラ肺炎の占める割合は高くなると報告されている。

D. 考察

1991年に旧厚生省班がレジオネラ肺炎の診断・検査及び治療指針が発せられてから10年以上経過し、その間に医療技術が飛躍的に進歩している。1999年感染症新法の制定によりレジオネラ肺炎は全数届出対象となり、その症例数は年々増加傾向にある。市中肺炎散发例の報告のみならず集団発生、院内感染の報告も散見されるようになった。我々はこれまで、レジオネラ肺炎の臨床の現状を把握するために、尿中抗原検査の有用性の検討及び実際のレジオネラ肺炎症例への実地臨床での対応について検討してきた。今回市中肺炎に占める実際の頻度を検証するために、当院での市中肺炎の原因微生物の前向き検討を行った。結果は、母集団が少ないものの、本邦の他の報告とほぼ同様で、頻度は欧米と比べ低いというものであった。この要因については既知の報告でさまざまに考察されており、本邦の建造物の建築様式、欧米と違いCooling towerを介しない空調設備などが挙げられているが、不明の部分も多いと考えられる¹⁾。また、文献的には、欧米では重症度別に検討したうえで、より重症の市中肺炎の中にはレジオネラ肺炎の占める割合がより高くなると報告している。本邦でも学会や論文報告例のほとんどが、市中肺炎散发例における重症例である。日本呼吸器学会の市中肺炎診療ガイドラインでは、重症肺例には原因微生物が判明するしないに関わらず、初期治療にレジオネラ肺炎を想定したキノロン系薬やマクロライド系薬をβラクタム系薬と併用するよう述べており、そういった意味からは実地臨床での対応については現在及び今後も問題ないものと考えられた。

レジオネラ肺炎の更なる臨床の向上に向けて今後の課題を以下のようにまとめてみた。

1) 診断技術の向上

公衆衛生の観点から、感染症診断においては迅速性と特異性についての技術向上が求められている。近年、従来のPCR法よりもより多くの病原微生物を迅速に把握できるreal time PCR法¹⁰⁾や、DNAチップ¹¹⁾が開発され有用であることが示されてきている。当科にても喀痰などに対しreal time PCR法を用いた検討を行っている。しかしこれらの普及と標準化には、コスト面、偽陽性偽陰性の問題など解決すべき点が少なくないのも事実である。

2) 軽症中等症肺炎の検討

市中肺炎散発例の報告のみならず、特に集団発生例においては、死亡するような重症例だけでなく、軽症の症例（発熱を中心としたポンティアック熱も含まれると考えられる）も多く認められることが報告されている⁴⁾。そういったことから学ぶとすれば、日常遭遇する市中肺炎の特に軽症例のなかにもレジオネラ肺炎が認められうるという認識を持つことである。既知の市中肺炎の報告例並びに今までの私どもの施設の前向き検討では、現在までのところ実際にそれを伺うことはできていないが、今後も問診診察を中心に疾病の存在を念頭においた診療を心がけるべきと考えられた。また今後もこういった検討を継続するべきと考えられた。

E 結語

本邦におけるレジオネラ肺炎の臨床について検討した。診断や治療の方法はここ数年で進歩したが、本邦でのレジオネラ肺炎の実像をさらに明らかにするために、今後も検討を重ねることが重要と考えられた。

文献

- 1) Ishida T, et al : Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients: a 3-year prospective study in Japan. Chest 114: 1588-1593, 1998
- 2) 成人市中肺炎診療ガイドライン 日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会 2005 (改訂中)
- 3) Miyashita N, et al: Community-acquired pneumonia in Japan: a prospective ambulatory and hospitalized patient study. J Med Microbiol. 54: 395-400 2005
- 4) 化学療法の領域: 20: 56-69, 2004
- 5) 藪内英子他: 日向市の新設温泉施設を感染源とするレジオネラ症集団発生.感染症誌 78: 90-98, 2004
- 6) Macfarlane JT, et al: BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults. Thorax 56: 1-64, 2001
- 7) Mandell LA, et al: Canadian guidelines for the initial management of community acquired pneumonia . Clin Infect Dis 31: 383-421, 2000
- 8) Ruitz M, et al: Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity, and severity. Am J Respir Crit Care Med 160: 397-405, 1999
- 9) American Thoracic Society: Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 163: 1730-1754, 2001
- 10) Mackay IM: Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiol Infect 10: 190-212, 2004
- 11) Mitterer G, et al: Microarray-based identification of bacteria in clinical samples by solid-phase PCR amplification of 23S ribosomal DNA sequences. J Clin Microbiol 42: 1048-1057,

2004

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし

2. 学会発表

馬庭 厚, 田口善夫, 富岡洋海, 岩崎博信, 石原亨介, 富井啓介, 梅田文一, 黄 文禧, 網谷良一, 福井基成, 石田 直, 伊藤 稔, 伊藤功朗, 三嶋理晃, 吉田真一 関西地区のレジオネラ肺炎の臨床的検討 第75回日本感染症学会西日本地方会総会 2005.11.17 長崎

馬庭 厚, 田中栄作, 井上哲郎, 櫻本 稔, 水口正義, 前田勇司, 谷澤公伸, 竹田知史, 岡元昌樹, 小松 方, 田口善夫, 吉田真一

当院における市中肺炎の起炎菌の検討 第66回日本呼吸器学会近畿地方会 2005.12.10 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 市中肺炎の原因微生物の頻度(%)

	5大学(琉球、長崎、久留米、東北、川崎)と関連病院	倉敷中央病院	川崎医大	当院
調査期間	1999-2000	1994-1997	1998-2003	2004-2005
入院・外来	入院	入院	入院	入院64 外来29
Age	17-99 mean 不明	18-93 mean 65.2	16-97 mean 61.5	16-87 mean 67.2
症例数	232	326	400	92
<i>S. pneumoniae</i>	24.9	23	26.3	()内は実数 28.0 (26)
<i>H1 influenzae</i>	18.8	7.4	13	17.4 (16)
<i>M. pneumoniae</i>	5.2	4.9	9.3	2.2 (2)
<i>C. pneumoniae</i>	6.6	3.4	6.8	9.8 (9)
<i>Legionella</i> spp.	3.9	0.6	1.5	1 (1)
<i>S. aureus</i>	3.5	2.1	3.3	1 (1)
<i>C. psittaci</i>	2.2	2.1	1.3	2.2 (2)
<i>M. catarrhalis</i>	2.2	1.8	3.5	2.2 (2)
<i>K. pneumoniae</i>	0.9	4.3	2	1 (1)
<i>S. milleri</i> group	1.3	3.7	1.8	
Anaerobes	1.2	2.5	5.5	
<i>Coxiella burnetii</i>	0.9		0.5	2.2 (2)
<i>Ps. aeruginosa</i>	0.4	2.5	2	1 (1)
fungi	0.4			1 (1)
viruses	22.7	2.1	3	1 (1)
その他	4.5		0.8	11.8 (11)
複数菌感染の割合	18.5	4.3	14	39.8 (37)
不明	23.7	39	34.5	

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—

分担研究者

佐賀大学医学部臨床検査医学講座助教授 青木洋介

A：研究目的

レジオネラ属菌への集団曝露事例では、健康被害調査対象者が多数にのぼるため、レジオネラ肺炎を疑った通常の診療（問診、血液検査、X線検査、喀痰検査）を一律に施行することは医療財源観点からその実効が容易ではない。本研究では過去の集団感染事例の疫学的調査データをもとに、曝露者の臨床的背景と尿中レジオネラ抗原検査を組み合わせることにより、本感染症の定量的診断確率を求めることを目的とした。

B：研究方法

臨床疫学的診断手法の一つである Bayes 解析による診断確率の算出法について検討した。問診項目として1) 発熱、2) 喫煙歴の有無、3) 基礎疾患、4) 飲酒歴の4項目を選択し、これらの有無別の組み合わせでレジオネラ症の検査前確率を計算した。その後、尿中抗原検査結果により検査後確率を計算した。確率は各因子の陽性尤度比あるいは陰性尤度比を乗じることにより求められる。上記の4問診項目の感度・特異度および尤度比については前年度の研究報告書に記載されている。

C：研究結果

臨床因子の解析結果より、曝露者の性別に異なる診断確率フローチャートを作成した（総合研究報告書に記載）。男性では、問診結果から求められる検査前診断確率が50%を超える者を対象に尿中抗原検査を施行し、その検査後確率が50%を超える場合に要医療と判定することが推奨される。女性では、問診後の検査前確率が80%を超える場合には、尿中抗原検査を施行せずに（あるいは検査結果に関係なく）要医療と判定して支障がないものと考えられた。

D：考察

Bayes 解析による診断精度を高めるには、今後は“罹患あり”だけでなく、“罹患無し”の者についての臨床情報の収集が必要である（診断因子の特異度に正確を期すため）。臨床疫学的診断手法は、客観性・再現性において優れており、短時間に多数の健康被害状況をスクリーニングするに際し有用であると思われる。特定地域・環境における集団感染症への一次的医療対応がこのスクリーニング法の良い対象となる。

E：結論

本研究で考案した診断フローチャートは、レジオネラ感染症の診断確率に基づき曝露者への医療対応の方針決定に客観的示唆を与える。研究結果は過去の事例の解析に基づくものであるため、今後、同様のレジオネラ集団曝露事故が発生した際に、その有用性についての検証が成されることが必要である。

臨床疫学的診断法は、その基本データの正確性が保障される限り極めて簡易で実用的な診断ツールと成りえる。集団感染事例のみでなく、多様な疾患の診断法としてその概念が普及することが望まれる。

F．健康危機管理情報

該当事項なし

G．研究発表（論文発表，学会発表）

平成18年 日本感染症学会総会で発表予定（演題採択）

H．知的財産権の出願・登録

該当事項なし