

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 15 年度—平成 17 年度
総合研究報告書

主任研究者 吉田 真一

平成 18 年（2006 年）3 月

目次

I. 総合研究報告書	
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	13
古畑勝則	
2. <i>Legionella pneumophila</i> の病原性と消毒に関する研究	23
宮本比呂志	
3. レジオネラの自然環境宿主および感染宿主への感染性及びそれらに影響を及ぼす 菌体因子に関する研究	33
三宅正紀	
4. レジオネラの遺伝子検査および抗体検査法の作成に関する研究	45
江崎孝行	
5. レジオネラ肺炎診療の現状に関する研究	49
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 －特に集団感染事例の医療トリアージ法の開発－	53
青木洋介	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	61
IV. 研究成果の刊行物・別刷	73

I. 総合研究報告書

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

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業） 総合研究報告書

生活環境中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・教授

研究要旨

Legionella 属菌は土壌や湖沼などに生息し、人工環境下のビルの冷却塔水、温泉浴槽、24 時間風呂等の家庭用循環式浴槽や噴水などの修景用水が感染源になる。近年、温泉水を感染源とするレジオネラ集団感染が発生し注目されている。生活環境でのレジオネラ感染を予防するために、疫学的調査、病原性の解析、迅速診断法の開発、臨床的調査研究を行った。

全国の温泉水 710 検体中 28.7%にあたる 204 検体からレジオネラが検出された。分子疫学的な手法であるパルスフィールドゲル電気泳動(Pulsed-Field Gel Electrophoresis: PFGE)と Random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) 法を比較した。菌株の類似性を検討するには RAPD-PCR 法がすぐれていること、LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法は従来の PCR(Polymerase Chain Reaction)法に比べ、レジオネラ属菌の検出に感度及び操作性ともに優れていることを明らかにした。

L. pneumophila にはバイオフィーム形成能があり、37℃、42℃では菌体が多核でフィラメント状になるという興味深い知見を得た。

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。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。

塩素消毒の pH による効果のちがいと、消毒剤に接触したレジオネラの病原性について研究した。塩素の殺菌能は高 pH になるほど低下することが確認されたが、いずれの pH でも一旦減少した菌数が増加する現象が認められた。この現象は「塩素消毒により菌が損傷を受け、生きているが培養できない状態に一時的に陥っている」ことに起因することが判明した。この知見は、塩素消毒は単回施行では不十分であり、連続的に行うことで塩素濃度を継続的に維持する必要があることを示している。また、この塩素損傷菌はモルモットに対する病原性を失っていたので、塩素消毒が推奨されている浴槽水においては現行の培養法によるレジオネラ検出基準（検出限界以下）が妥当であることを示している。

病原性に関しては、自然界から分離される L. pneumophila すべての株に病原性があること、新しい病原因子として、L. pneumophila の細胞内増殖に必要な PmiA、細胞内侵入に関与する IcmN、L. dumoffii の細胞内感染に必要な DnaI、細胞内侵入に関与する TraC を見だし発表した。

レジオネラ感染症の迅速診断法の開発では、遺伝子検出法として、L.pneumophila の全血清型（1 から 15 型）に対応する検査、Legionella 属の全菌種に対応できる PCR 法、マイクロアレイ法による検査法を作成した。一方、患者の抗体検出法として、LPS を抗原として血清群 1 から 15 までの抗体を検出できる蛍光ビーズアレイを完成させた。

臨床的調査研究では尿中抗原検査の有用性、治療薬としてフルオロキノロンの有効性を明らかにし、市中病院において実際の症例について診断と治療の現状をまとめた。また、集団感染事例の発症においては、孤発例とは異なる診断基準を備えるべきであり、問診と尿中抗原検査の組み合わせによるレジオネラ症診断確率を算出する方法を創案した。

研究分担者

江崎孝行（岐阜大学大学院医学研究科・教授）
宮本比呂志（佐賀大学医学部・教授）
古畑勝則（麻布大学環境保健学部・助教授）
田口善夫（天理よろづ相談所病院呼吸器内科・部長）
三宅正紀（静岡県立大学薬学部・講師）
青木洋介（佐賀大学医学部・講師、平成16—17年）
藪内英子（平成15年のみ）

研究目的

本研究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、ことを目的とした。

研究成果

1. レジオネラの分布と生態に関する研究

環境中に生息するレジオネラの生息状況・分布・生態を知ることが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。

一方、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た。

1) 全国の温泉のレジオネラ生息状況

全国各地の温泉水 710 試料について培養法によってレジオネラ属菌の検出を試みた。43 都道府県で採取した温泉水から 204 試料 (28.7%) から検出され、全国各地に生息していることが判明した。また、分離された菌種はほとんどが *L. pneumophila* であり、中でも血清群 1 群および 5 群が多く分離される傾向があった。これらの菌株について薬剤感受性などの特性を明らかにするとともに、遺伝子生物学的な検討を行った。この調査によりレジオネラ属菌の生態学的特徴を把握でき、感染源対策に有用なデータが得られた。温泉水における本菌の情報は非常に少なく、今後改訂される「レジオネラ症防止指針」にも追記されることを希望する。(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)

2) 温泉水から分離されたレジオネラの薬剤感受性試験

レジオネラ症に関する疫学的研究の一環として、2003 年に全国各地の温泉浴槽水から分離された *L. pneumophila* 124 株について E-test により 10 薬剤に対する薬剤感受性を検討した。その結果、供試薬剤のうち抗結核剤である rifampicin の MIC₉₀ が 0.125 $\mu\text{g/ml}$ と最も優れた抗菌力を示した。次に, levofloxacin と imipenem が 4 倍差の 0.5 $\mu\text{g/ml}$, azithromycin と sparfloxacin が 8 倍差の 1 $\mu\text{g/ml}$, erythromycin, clarithromycin および gentamicin が 16 倍差の 2 $\mu\text{g/ml}$ であった。ところが, minocycline は 16 $\mu\text{g/ml}$,

piperacillin は $>256 \mu\text{g}/\text{ml}$ と高値を示し、それぞれ 128 倍および 4,096 倍、rifampicin より劣っていた。

以上のように、温泉浴槽水由来株の薬剤感受性は、臨床分離株や土壌由来株のそれと比較してやや低い傾向が認められた。(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)

3) パルスフィールドゲル電気泳動による分子疫学的調査

本菌の疫学的調査は、主に血清学的手法によって行われているのが実情である。しかし近年、分子疫学的な手法の一つであるパルスフィールドゲル電気泳動(Pulsed-Field Gel Electrophoresis : PFGE)を用いて DNA 断片の泳動パターンを解析することが菌株間の類似性を知るために有用であることが報告されている。そこで、*L. pneumophila* の疫学的な基礎的検討として、東京都内で分離された *L. pneumophila* 1 群の臨床由来株と環境由来株について、PFGE により株間の類似性について検討を行った。その結果、同一血清群の *L. pneumophila* であっても PFGE 泳動パターンは多岐に渡ることが判明した。臨床由来、冷却塔水由来、浴槽水由来、土壌由来および水景用水由来において、各由来ごとの明確な同一パターンは認められず、多様な泳動パターンを示すことが明らかになった。(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) RAPD-PCR 法を用いた UPGMA クラスタ解析の評価

Legionella pneumophila に関する分子疫学的研究の一環として、温泉水から分離した *L. pneumophila* 1 群株について RAPD-PCR 法と PFGE 法を比較し、どちらが感染源、感染経路の特定に有用な分子疫学的解析であるかを検討した。RAPD-PCR 法は、Bansal らの方法に準拠して以下の方法で行い、結果を UPGMA クラスタ解析した。類似度 90%以上で類別を行ったところ 18 群に分けられた。類似度 75%で分けると北海道グループ、関東甲信越・東海地方グループ、および中国地方グループの 3 群に類別された。RAPD-PCR 法は PFGE 法に比べてバンド数が少なく、迅速かつ簡便であり、泳動パターン解析から分離株の類似性が速やかに判断できた。RAPD-PCR 法は本菌の血清型より下の分類を行うために優れており、感染源、感染経路の特定に有用な分子疫学的解析であることが示された。

5) バイオフィーム形成の研究

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生息している。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い。われわれは、レジオネラ属 3 6 種、総計 5 0 株の菌のバイオフィーム形成能をしらべた。25℃、37℃、42℃で Buffered yeast extract (BYE)液体培地にて静止培養を行い、ガラス製の試験管の壁面にバイオフィームが形成されているかを、1 カ月に渡って観察した。その結果、この条件でバイオフィームを形成するのは *L. pneumophila* であり、その他の菌種のバイオフィーム形成能は悪かった。37℃のバイオフィームは繊維状の菌が絡んでいるような構造になっていることがわかった。42℃でのバイオフィームも同じく形成速度が速く、厚さ、菌の形態も同様であった。塩酸一ギムザ染色法で菌体の核を染めてみたところ、繊維状に伸長した菌体は多核であることが認められた。一方、25℃でのバイオフィームの菌は、短桿状の形態であった。つまり、温度差によって、バイオフィームに宿る菌の形態に相違がある、ということを発見した。(Piao Z, Sze C C, Barysheva O, Iida K, and Yoshida S. Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. 72(2):1613-1622, 2006.)

2. 病原性に関する研究

レジオネラ属菌は環境中ではアメーバなどの細菌捕食生原虫の中で増殖する。生体に感染後はマクロファージや呼吸器上皮細胞の中で増殖し肺炎を起こす。このように細胞内増殖能力を有するということがレジオネラの

病原性の最も重要な部分である。本研究では *L. pneumophila* の病原遺伝子の接合による伝達、ストレスタンパクの発現、*L. dumoffii* の細胞内侵入と増殖に必要な遺伝子についての研究を行った。

1) 接合による病原変換の証明

病原性プラスミドやファージなどによる菌株の病原変換はよく知られた現象であるが *L. pneumophila* では報告されていなかった。*L. pneumophila* 弱毒株が強毒株に変換（病原変換）することを見いだしたので、その機序を明らかにするため実験を行った。その結果、病原変換の機序は染色体上の病原遺伝子の接合伝達であることを明らかにした。染色体の接合伝達による病原変換はこれまでに報告が無く、*L. pneumophila* で初めて明らかにされた現象である。(Miyamoto H, Yoshida S, Taniguchi H, and Shuman HA: Virulence conversion of *Legionella pneumophila* by conjugal transfer of chromosomal DNA. *J. Bacteriol.* 185(22), 6712-6718, 2003)

2) レジオネラの宿主に対応したストレス応答

L. pneumophila は病原株、非病原株ともに、熱などの *in vitro* 刺激に対して同様なストレス応答を示す。しかし感染細胞内では宿主依存的なストレス応答を示すことを見いだした。

病原株は自然環境宿主であるアメーバ内ではストレス応答自体が弱く、感染宿主であるマクロファージ内では様々なストレス誘導タンパクを発現する。一方、非病原株では宿主感染直後より全菌体タンパクの合成阻害が起こることを明らかにした。レジオネラ属菌の宿主依存的なストレス応答、さらに病原株及び非病原株の感染宿主内での挙動の相違に関する分子機構を解明することによって、菌の宿主内増殖のコントロールを可能にすべくその応用基盤を確立することが期待される。(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)

3) 代謝の研究

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。本研究におけるプロテオーム解析は、*L. pneumophila* JR32 株由来のタンパクの二次元電気泳動、Cy Dye による標識、MALDI-TOF MS (ultraflex, Bruker) を用いて蛋白質の同定を行った。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。

4) レジオネラの病原遺伝子/病原因子の探索

Tn mutagenesis によって作成した *L. pneumophila* の *icmN* ノックアウト株を用いて、細胞への接着、侵入、細胞内増殖を観察した。Tn mutagenesis によって作成した *L. pneumophila* の *icmN* ノックアウト株は、鞭毛を形成できないこと、上皮細胞への侵入能が低下するが、細胞内増殖能はあるを見いだした。*L. pneumophila* の *icmN* 遺伝子は鞭毛の発現を支配し、菌の上皮細胞への定着・侵入に関連することを明らかにした。*L.*

pneumophila の icmN 遺伝子が上皮細胞内への侵入に関与していることが示され、病原性の解析に新たな局面を開いた。

5) 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。*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。パ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。

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。

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。(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).

6) 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。*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。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、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。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。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。また、*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。

7) *Legionella dumoffii* の細胞内増殖に必要な遺伝子の研究

Legionella dumoffii は在郷軍人病の原因菌の一つである。*L. dumoffii* は、マクロファージ内で増殖できることが報告されているが、その細胞内増殖機構をさらに深く理解するために、トランスポゾン挿入変異株の中から細胞内増殖ができない変異株を分離することを試みた。790 株のトランスポゾン挿入変異株をスクリーニングした結果、我々は 4 株の細胞内増殖できない、または、低下した変異株を得た。4 株の細胞内増殖低下変異株のうち、2 株は *L. pneumophila* において細胞内増殖に必須であると言われている *dot/icm* 遺伝子群内の *icmB* 及び *dotC* と相同性のある遺伝子にトランスポゾンの挿入があることが示された。また、細胞内増殖低下変異株の 1 株は、*djlA* 遺伝子(*dnaJ*-like A 遺伝子)に変異が認められた。*DjlA* タンパクは *DnaJ/Hsp40* タンパクファミリー群の一員である。共焦点蛍光レーザー顕微鏡下で観察した結果、野生株の場合と異なり、*L. dumoffii* の *djlA* 変異株を感染させたマクロファージのファゴソームは後期エンドソーム・リソソームマーカー

一である Lysosomal membrane protein-1(LAMP-1)及び LAMP-2 と局在が一致した。これより、この変異株はファゴソーム・リソソーム融合阻害ができないことが示唆された。透過型電子顕微鏡下では、*L. dumoffii* DjlA 変異株は、野生株と異なり、宿主細胞の粗面小胞体を周囲に集めることができないことが観察された。さらに、*L. dumoffii* の DjlA 変異株は過酸化水素、高浸透圧、及び、高温のストレスに対して、野生株に比較し、高い感受性を示した。これらの結果より、*L. dumoffii* の DjlA タンパクは、細胞内増殖及び細胞内小器官の移送だけでなく、細胞外環境ストレスに対する菌の抵抗性にも必要であることが示唆された。この報告は、DjlA 遺伝子単独欠損変異株が明確な表現型を示すことを述べた最初の報告である。(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)

8) *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 と同源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。*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。

9) *L. pneumophila* の病原性を調べるアメーバ寒天法の開発

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 1 0 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。その結果、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数える定量法である」ことも示している。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。(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.)

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。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も必要となってくる。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。レジオネラ属の菌種を識別する簡便な同定方法が市場になく、菌種レベルの報告が少ない。また血清抗体価は全菌体、及び蛍光抗体をつかっただけのものしか使用されていない。特異的な抗原をつかっただけの簡便な抗体計測の系が市場にないため正確な疫学情報が得られない状況であり、この状況を打開したい。

1) シリコンチップを使った *Legionella* 属の全菌種の検出同定法の作成

Legionella 属の菌種の検出同定を網羅的に行うために、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 シリコン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。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。

この同定原理の実用化に向けて、レジオネラ属に共通な16S rDNA Primerを使って増幅したPCR Ampliconを3mm x 3mmのsiliconアレイに固定してあるレジオネラ属の主要な30菌種に特異的なオリゴDNAプローブと反応させて検出と同定を行なう方法を作成した。その方法はPCRチューブにSiliconチップを入れて、検体からのDNAを増幅し、増幅産物と反応したプローブをCCDカメラで撮影、液晶モニターでスポットを確認するというものである。

2) Real time PCR法を使ったLegionellaを含む肺炎病原体の網羅的スクリーニング方法の作成

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。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。その結果リボソーム遺伝子を増幅する方法より約1000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。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。

16種類の病原体を同時に増幅する方法を作成した。増幅産物はサイバークリーンでモニターした。特異性は増幅産物のTmで確認する方法を採用した。検出できる病原体は、マイコプラズマ、MRSA黄色ブドウ球菌、クジラ、レジオネラ・ニューモフィラ、レジオネラ属菌群、結核菌、抗酸菌群肺炎双球菌つつがむしり病原体、Q熱病原体、インフルエンザ桿菌、バルトネラ属菌群、リッチ7/エルカ7、炭疽-セレウス菌群、細菌全般、カビ・酵母全般である。

3) 蛍光ビーズ法を使ったレジオネラ6血清型に対する血清抗体の同時計測法の作成

レジオネラに対する抗体価を計測する方法としてLegionella pneumophila serogroup 1の菌体を使用した間接蛍光抗体法や、全菌体を使ったELISA法による抗体計測が実施されているが、そのほかの血清型別は通常は行われていない。本研究でレジオネラの7種類の蛋白抗原を発現させ特異的な抗体を計測する方法を作成してきた。しかしこの方法では各血清型に対応する抗体の計測ができなかったため、方針を変更し、6種類のレジオネラの血清型に対応する抗体の計測を行う方法の作成を試みた。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種類の異なる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。

蛍光ビーズに固定したレジオネラの6種類のLPS抗原を使って、市販のウサギ血清（デンカ生検）を使って有効性を確認した。さらに保存してあるレジオネラ患者血清による測定でも特異的な反応が得られた。マルチプレックス蛍光ビーズアレイ法は研究用、及び診断用抗原として応用できることが、確認できたので、これをキットとして提供するための準備を進めている。

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。

5) FACSscan 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 FACSscan 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行っている。

6) LAMP 法の有用性

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。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。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。(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.*, 10(3):117-120, 2005) (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)

4. レジオネラ感染に対する生体の反応に関する研究

1) 家庭用 24 時間風呂使用者と非使用者のレジオネラ抗体価

発病歴はないのにレジオネラ抗体価が上昇している人は多く、その人達は不顕性感染になっていると考えられる。知らず知らずのうちにレジオネラに曝露されているのである。家庭用の 24 時間風呂の使用者はレジオネラ感染症の発病は有意に多くはないが、抗体保有率が高いことを示してきた。今回それら抗体保有者が 24 時間風呂の使用をやめた場合、抗体価が 3 年後にどのような変化を示すかを調査した。

平成 12 年に家庭用 24 時間風呂使用者と非使用者のレジオネラ抗体価について調査を行い報告した (*J.Occup.Health*, 2000 42;205-212)。前回調査より 3 年経過し、レジオネラ抗体価がその後どのように変動したかの追跡調査を家庭用 24 時間風呂使用状況に基づき行った。レジオネラ抗体価追跡調査において、家庭用 24 時間風呂使用をやめた人はレジオネラ抗体価が下がることを明らかにし、家庭用 24 時間風呂の使用が実際にレジオネラ感染の機会を増やしていることを示した (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)

2) レジオネラ感染に対する感受性の年齢と性差についての研究

レジオネラ感染 (肺炎) は高齢者に多く、また男性が女性よりも罹患が多いことがわかっている。その原因を解明するために老齢マウスを用い、個体レベル、細胞レベルで感染の感受性を比較した。マウスへの感染実験を行い、発病、生死の率を観察した。マクロファージへの感染実験を行い、細胞内での増殖を測定した。老齢マウスと若いマウスのレジオネラ感染に対する感受性を経鼻感染によって観察したが、投与菌数が少なかったため、マウスの死亡が観察されなかった。そこでマクロファージ内での菌の増殖を比較した。老齢雄マウスのマクロファージは老齢雌マウスのマクロファージよりも *L. pneumophila* の増殖を許した。個体レベルでは差を検出することはできなかったが、細胞レベルで、雄マウスのマクロファージは雌マウスのマクロファージよりもレジオネラの増殖を許すことが明らかとなった。マウスでも雌のマクロファージは雄のマクロファージよりもレジオネラの増殖を許さないことがわかった。この機序の解明はヒトのレジオネラ感染の感受性の性差を解析するのにいいモデルになると考えられる。

5. 感染予防に関する研究

身近な環境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、不快感をもたらさない殺菌剤の開発が急がれる。

1) 水利用設備からのレジオネラの除菌の研究

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。

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。(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.)

2) 塩素消毒の pH による効果のちがいと、消毒剤に接触したレジオネラの病原性

アルカリ領域における塩素の *Legionella pneumophila* に対する消毒効果と塩素損傷レジオネラの病原性に関する研究を行った。

塩素接触試験は以下のように行った。BCYE 培地で3日間前培養した菌株を、pH 8.0 から pH 10.0 に調整した 3mM リン酸緩衝液に約 5×10^6 CFU/mL になるよう懸濁した。別途、各 pH のリン酸緩衝液に次亜塩素酸ナトリウムを適宜添加して遊離塩素濃度が約 1.0 ppm (pH 9.2 と 10.0 での実験では遊離塩素濃度が約 2.0 と 4.0 ppm の塩素溶液も作成) の塩素溶液を作成し、同一の pH の菌懸濁液と塩素溶液を等量混合してレジオネラと塩素を接触させた。塩素接触静置中、2分または5分間隔で 0.01M (終濃度) のチオ硫酸ナトリウム液を添加してレジオネラと塩素の接触を停止し、試験液を適宜希釈して BCYE 培地に塗布し、37℃ で培養した。

2重蛍光染色法による菌数計測は CFDA アセトン溶液(終濃度 150mg/ml) とエチジウムブロマイド水溶液(終濃度 100 mg/L) を加え染色によった。エチジウムブロマイド陽性菌数、CFDA 陽性菌数をそれぞれ、全菌数、生菌数と判定した。

塩素損傷菌のモルモット感染実験は、pH9.0、遊離塩素濃度 0.7 ppm の条件で塩素に 17 分間接触させたレジオネラ菌液(生菌数は 7.4×10^4 cells/mL で培養可能菌数は 10 CFU/mL 未満) を 3 匹のモルモットの腹腔内に 5 mL ずつ注射し、発熱の有無を一週間観察した。

塩素の殺菌能は高 pH になるほど低下することが確認されたが、いずれの pH でも一旦減少した菌数がその後増加する現象が認められた。蛍光染色法を培養法と併用することで、この現象は「塩素消毒により菌が損傷を受け、生きているが培養できない状態に一時的に陥っている」ことに起因することが判明した。また、生きているが培養できない状態の塩素損傷菌はモルモットに対する病原性を失っていることも明らかとなった。培養法で検出できない状態の塩素損傷菌が病原性を示さないという知見は、塩素消毒が推奨されている浴槽水においては現行の培養法によるレジオネラ検出基準(検出限界以下)が妥当であることを示している。また、「培養不能状態に陥った塩素損傷菌が一時的に培養能を回復する」という知見は、塩素消毒は単回施行では不十分であり、連続的に行うことで塩素濃度を継続的に維持する必要があることを示している。

6. 臨床的診断・治療に関する研究

1) レジオネラ症の臨床疫学的後ろ向き調査研究 (2000-2003 年)

天理よろづ相談所病院にて2000年4月から2003年12月までにレジオネラ肺炎を疑いレジオネラ尿中抗原検査を施行した100例(当院の症例67例と近隣の市中病院の症例33例)について後方視的に検討を行った。検査を行った100例中96例は重症肺炎であり、その中でレジオネラ肺炎確定診断例は11例であった。そのうち10例が尿中抗原検査で診断し治療を行っていた。近年日本においてレジオネラ肺炎の報告が増加し疾患の認知度も向上する中で、レジオネラ尿中抗原検査はその利便性と迅速性から、今後さらに必要性が増すものと考えられた。

2) レジオネラ症の臨床疫学的前向き調査研究 (2004-2005 年)

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。

天理よろづ相談所病院での市中肺炎(合計92例)の原因微生物の頻度を検討した。うち、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例であった。米国感染症学会(IDSA)ガイドラインにおける重症度の検討では、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例であった。

原因微生物(混合感染を含む)とその頻度は、*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%)であった。以上、原因が判明したのが55例(59.8%)うち混合感染11例、原因不明37例(40.2%)であった。

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。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。

3) 尿中抗原検査の有用性

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。

(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。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した。

7. レジオネラ症集団発生への対応

レジオネラ集団発生の現場に赴き、原因の調査、患者の発生の状況、対策を実施することは今後のレジオネラ発生を予防するために多くの教訓を得ることができる。本研究では平成14年に起こった宮崎県日向市でのレジオネラ集団感染についての疫学調査を行い、結果を報告するとともに、施設への改善策を指示した(感染症学雑誌 78 (2) : 90-98, 2004)。

8. 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の開発

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。

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。臨床因子の解析結果より、曝露者の性別で異なる診断確率フローチャートを作成した。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。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。

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。

9. 今後のレジオネラ感染予防のために(まとめにかえて)

温泉水のレジオネラ汚染が高率であることがあらためて示され、特に循環式浴槽でレジオネラを増殖させない消毒法の実施が感染予防に重要であること、中央循環式の給湯設備のレジオネラ除菌には、給湯水の昇温循環運転(75℃で24時間)、その間の末端給湯栓からの放水作業、貯湯槽の清掃、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。

生活環境水のレジオネラの菌種、血清型、生菌数を迅速に安価に網羅的に検出する方法の開発はレジオネラ感染予防のために強く望まれていることである。今回の研究で、遺伝子検出法の開発はかなり進んだものの、未だ定量性には難がある。FACSを用いた迅速診断法など、遺伝子に頼らない発想の転換も必要であろう。

臨床診断は尿中抗原検出キットの上市により、飛躍的に簡易になり、また確度も高くなった。L. pneumophila SG1にのみ検出するという限界を超えた検査法が開発が望まれる。

レジオネラの細菌学では基礎的研究が欠かせない。L. pneumophila がバイオフィルムを形成し、多核の繊維状菌体となること、その他、細胞内侵入と細胞内増殖に関与する新規遺伝子の発見を予防や治療に生かすよう、今後も研究を続けなければならない。

近年、循環濾過式浴槽に注意が向けられているが、冷却塔水、噴水などの修景水、雑用水などがレジオネラの生息場所、増殖場所であることに変わりはない。今後とも監視を続けることが必要である。

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* の病原性と消毒に関する研究

宮本比呂志

3. レジオネラの自然環境宿主およびへの感染宿主への感染性及びそれらに影響を及ぼす菌体因子に関する研究

三宅正紀

4. レジオネラの遺伝子検査および抗体検査法の作成に関する研究

江崎孝行

5. レジオネラ肺炎診療の現状に関する研究

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

－特に集団感染事例の医療トリアージ法の開発－

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

A. 研究目的

Legionella 属菌は自然環境下の土壌や湖沼などに広く生息している。一方で人工環境下のビルの冷却塔水、温泉浴槽、24 時間風呂等の家庭用循環式浴槽および噴水などの修景用水からも分離されている。また、*L. pneumophila* は呼吸器系の病原細菌であり、レジオネラ肺炎やポンティアック熱を起こすことが報告されている。

近年、温泉水においてレジオネラ属菌による感染症が注目されており、1999 年には感染症新法において新興感染症の起炎菌として四類感染症に指定された。それ以降 2002 年 12 月末までに 465 例のレジオネラ症患者が報告されている。2002 年 7 月には宮崎県の温泉施設において本邦では最大規模の 295 名が発症し、7 名が死亡する集団感染例があった。本事例では温泉ブームを背景に大きな社会問題に発展し、感染源対策が急務とされている。

本菌の疫学的調査は、主に血清学的手法によって行われているのが実情である。しかし近年、分子疫学的な手法の一つであるパルスフィールドゲル電気泳動(Pulsed-Field Gel Electrophoresis : PFGE)を用いて DNA 断片の泳動パターンを解析することが菌株間の類似性を知るために有用であることが報告されている。また、Random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) 法などの遺伝子学的手法も注目されている。さらに、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。以上のことから、*L. pneumophila* の疫学的な基礎的検討として、東京都内で分離された *L. pneumophila* 1 群の臨床由来株と環境由来株について、PFGE により株間の類似性について検討を行った。また、温泉水から分離した *L. pneumophila* 1 群について RAPD-PCR 法を用いて遺伝子学的解析を行い、疫学的な基礎データを得ることを目的とした。さらに、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. 供試菌株

1) 都内で分離された臨床および環境由来の *L. pneumophila* 血清群 1 群 39 株を用いた。その内訳は臨床分離株 3 株 (CL1~CL3)、冷却塔水分離株 25 株 (CT1~CT25)、浴槽水分離株 7 株 (BW1~BW7)、土壌分離株 3 株 (SL1~SL3) および水景用水分離株 1 株 (DW1) である。

2) 2003 年から 2004 年にかけて全国各地の温泉水から分離した *L. pneumophila* 血清

群 1 群 40 株を用いた。

2. 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。

3. PFGE

PFGE は Schwartz らの方法に準拠して以下のとおり行った。

1) アガロースブロックの調製：供試菌を BCYE α 寒天培地(栄研化学)に塗抹して 37°C 72 時間培養後、平板上の菌苔を 1 μ l ディスポーザブルループで 1/2 量かき取って Pett IV 溶液(1M Tris-HCl, 1M NaCl) 1ml に浮遊させ、McFarland No. 0.5 になるように調整した。菌体を洗浄してから Pett IV 溶液 1ml に再懸濁し、2% インサートアガロース(BMA) と等量ずつ混和後、インサートモルド(Bio-Rad)に 100 μ l ずつ分注した。これを -20°C で 5 分間冷却し、さらに 4°C で 1 時間放置して固形化した。このアガロースブロック 1 個につき EC Lysis {6mM Tris-HCl (pH7.6)、1M NaCl、0.5M EDTA、0.2% Deoxycholic acid (Sigma)、0.5% N-Lauroylsarcosine (Sigma)、0.5% Polyoxyethylen(20) cetyl ether (Sigma)} 500 μ l と 100mg/ml Lysozyme (Amersham Pharmacia Biotech Inc) 5 μ l および 2 mg/ml Rnase {Ribonuclease A (Sigma)} 1 μ l をそれぞれマイクロチューブに入れて 37°C、4 時間インキュベートし、溶菌を行った。その後、ESP {1mg/ml Protenease K (Lifetechnologies)、0.5M EDTA (pH9.0)、1% N-Lauroylsarcosine (Sigma)} 500 μ l に 1 ブロックを入れ、50°C 16~24 時間インキュベートして徐タンパクを行った。反応後、Prote-nase K を失活させるため、TE buffer {10mM Tris-HCl (pH7.4)} 1ml と PMSF {0.1mol/ml Phenylmethylsulfonyl Fluoride (Wako)、Isopropanol (Wako)} 13 μ l を加えた溶液に 1 ブロック入れ、常温で 2 時間振盪した。その後、新たな TE buffer と PMSF に交換して 6 時間静置した。その後、15 分おきに TE buffer を 6 回入れ替えてブロックの洗浄を行った後、4°C で保存した。

2) 制限酵素による DNA の消化：DNA の消化には制限酵素 Sfi I (Toyobo) を用いた。反応液は、10 \times M buffer 20 μ l、2 \times ME {2-Mercaptoethanol (Sigma)} 14 μ l、DW 114.8 μ l と添付の M buffer に添加した Sfi I 12.5U をそれぞれマイクロチューブに入れて調整した。これに 1/2 量アガロースブロックを入れ、50°C で 16~20 時間インキュベートして消化後、電気泳動を行った。

3) 電気泳動：ゲルは 1.0% アガロースゲル {Certifide Molecular Biology Agarose (Bio-Rad)} を用いた。DNA 消化を行ったアガロースブロックの 1/3 量を泳動用ゲルのウェルに挿入した。また、サイズマーカーとして、Lambda DNA ladders (BMA) を用いた。泳動槽は CROSSFIELD (ATTO) を使い、泳動用 buffer は 0.5 \times TBE buffer (1.78M Tris、1.75M Boric acid、10mM EDTA) を用いた。泳動条件は、Buffer 温度 14°C、電圧 180V、パルスタイムは 45 秒、泳動時間 20 時間とした。泳動終了後、直ちにエチジウムブロマイド (0.5 μ l/ml) を用いて 15 分間染色し、その後蒸留水で 15 分間脱色してから UV 照射下で写真撮影を行った。

4) PFGE パターンの解析：供試菌株のゲノム DNA 制限酵素切断パターンをスキャナで取り込んだ後、解析ソフト (Phoretix 社：1D Advanced version 5.00) により、株間の

クラスター解析を行い、UPGMA法(Unweight pair group method using arithmetic averages、平均距離法)により系統樹を作成した。

4. RAPD-PCR法による遺伝子学的検討

RAPD-PCR法は、Bansalらの方法に準拠して以下の方法で行った。

1) DNAの抽出：供試菌をBCYE α 寒天培地に塗抹し、37°C72時間培養後、平板上の菌苔をかき取り、滅菌DW1mlに入れ、懸濁液がMcFarland No. 0.5になるよう調整した。この懸濁液を滅菌マイクロチューブに移し、12,000rpm、10分間遠心を行った。この操作を3回繰り返した後、High Pure PCR Template Preparation Kit(Roche)を用いて本菌のDNAを抽出した。

2) PCR法：PCR法の反応系は、DNAテンプレート5 μ l、dNTP(TaKaRa)5 μ l、Mg free Buffer(promega)5 μ l、MgCl₂ Buffer(promega)5 μ l、およびDNAtaq(フナコシ)1 μ lを、またランダムプライマーはプライマーI(AATCGGGCTG)およびプライマーL(TGCGGACCTG)各2.5 μ l、滅菌DW24 μ lを加え、合計50 μ lとし、Robocycler GRADIENT96(フナコシ)を用いた。反応条件は、95°C1分間の前熱変性の後、熱変性、94°C30秒、アニーリング36°C60秒、伸長反応72°C90秒を1サイクルとして30サイクル繰り返し、最終伸長反応を72°C8分間行った後、4°Cに保った。

3) 電気泳動：泳動用のゲルは1.2%アガロースゲル(Certified Molecular Biology Agarose(BIO-RAD))を用いた。PCR産物の確認は、泳動用ゲルに8 μ lの試料と2 μ lの電気泳動色素溶液を加えてウェルに挿入した。DNAサイズマーカーとして、Wide-RangeDNA Ladder(TaKaRa)を用いた。泳動槽はMy Run(Cosmo Bio)を使い、泳動用bufferは0.5 \times TBE buffer(1.78M Tris、1.75M Boric acid、10mM EDTA)を用いた。泳動条件は電圧100V、2時間泳動した。泳動終了後直ちに、エチジウムブロマイド(10 μ l/ml)を用いて60分間染色し、UV照射下で観察し、写真撮影を行った。

4) RAPD-PCRパターンの解析：供試菌株のRAPD-PCRパターンをスキャナで取り込んだ後、RAPD-PCR画像データについて解析ソフト(Phoretix社：1DAdvanced version 5.00)により、株間のクラスター解析を行い、UPGMA法により系統樹を作成した。

5. 培養法によるレジオネラ属菌の検出

1) 試料の濃縮：試料500mlを6,000rpm、30分間の遠心分離により最終的に5mlに再懸濁し、100倍濃縮試料を調製した。

2) 培養：「新版レジオネラ症防止指針」に準拠し、滅菌小試に分注した100倍濃縮試料1mlに1mlの0.2M HCl-KCl溶液(pH2.2)を加え、十分攪拌してから室温に15分間放置した。この試料をWYO α 寒天培地とGVPC α 寒天培地にそれぞれ0.1mlずつ滴下し、コンラージ棒で塗抹した。これを37°C、7日間培養後、両培地上でレジオネラ属菌の特徴を持つ集落を計数するとともに、これらの培地上から数個の集落を釣菌し、血液寒天培地とBCYE α 寒天培地に塗抹して37°Cで純培養と同時にシステイン要求性試験を行った。培養3日後、血液寒天培地には発育せず、BCYE α 寒天培地にのみ発育した菌株をレジオネラ属菌と推定し、グラム染色によって陰性桿菌であることを確認した。菌種の同定にはラテックス凝集反応、免疫血清凝集反応、DNA-DNAハイブリダイゼーションを用いた。なお、この試験での検出限界は10 CFU/100mlである。

6. LAMP法によるレジオネラ属菌の検出

LAMP 法は市販の「レジオネラ検出試薬キット E」を用い、添付資料に準拠した。まず、100 倍濃縮試料 2ml を 13,000×g、10 分間、4℃で遠心分離し、上清を除去して 40 μl 程度を残し、その沈査に「Extraction Solution for Legionella」50 μl を添加した。次にボルテックスミキサーで攪拌混合してから 95℃、15 分間加熱処理後、直ちに急冷し、1M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) 8 μl を添加して中和した。再度同条件で遠心分離し、上清を核酸抽出液とした。氷上にて LAMP 法反応試薬「マスターミックス」20 μl に核酸抽出液 5 μl を加え、Loopamp リアルタイム濁度測定装置を用いて 65℃で 60 分間増幅反応を行った。1 時間以内に増幅に伴う特徴的な濁度上昇が認められた試料をレジオネラ属菌陽性と判定した。なお、酵素失活処理を 80℃、2 分間行った。この試験での検出感度は 10 Cells/100ml である。

C. 研究結果

1. *L. pneumophila* 1 群の PFGE 像

供試菌株の泳動像は、分子量約 50~850kbp (kilobase pair ; 1 kbp は 1,000 塩基対に等しい核酸の長さの単位) の間に 5 本から 15 本のバンドが識別され、多様な泳動パターンが認められた。その中で 450~500kbp の間に 2 本のバンドが認められたものが 28 株 (72%) あった。その由来別では、冷却塔水由来が 23 株 (92%)、浴槽水由来が 3 株 (42.9%)、土壌由来と臨床由来がそれぞれ 1 株 (33.3%) であった。350kbp に 1 本のバンドが認められたものは 21 株 (53.8%) あった。その由来別では、冷却塔水由来が 17 株 (68%)、浴槽水由来が 3 株 (42.9%)、土壌由来が 1 株 (33.3%) であった。600kbp に 1 本のバンドが認められたものは 21 株 (53.8%) あった。その由来別では、冷却塔水由来が 16 株 (64%)、浴槽水由来が 4 株 (57.1%)、土壌由来が 1 株 (33.3%) であった。350kbp、450~500kbp および 600kbp にバンドが認められたものが 14 株 (35.9%) あった。その由来別では、冷却塔水由来が 12 株 (48%)、浴槽水由来が 2 株 (28.6%) であった。300kbp にバンドが認められた 14 株 (56%) と 750kbp にバンドが認められた 12 株 (48%) は冷却塔水由来であった。850kbp にバンドが認められた 4 株 (57%) は浴槽水由来であった。

2. PFGE 像のクラスター解析

供試菌株の PFGE 像をもとに系統樹を作成し、UPGMA クラスタ解析を行った。冷却塔水由来である CT1 と CT24 が類似度 73% と最も高く、次に CT5 と CT6 が 67%、CT2 と CT1、CT24 がそれぞれ 64% を示したが、他の菌株の類似度はさらに低かった。由来別では、冷却塔水由来 25 株中 14 株 (56%) と浴槽水由来 7 株中 2 株 (29%) は同じ由来間での類似度が 50% ≤ であった。臨床由来と土壌由来では類似度が 20% > であった。異なる由来間の比較においては、CT16 と BW7 では 55%、CT5、CT6 および SL3 では 53%、BW1 と CL1 では 50% の類似度を示したに過ぎなかった。また、浴槽水由来株は同一群に分布する傾向が認められたが、冷却塔水由来株は全体的に分布した。

3. *L. pneumophila* 1 群の RAPD-PCR 像からの解析

供試菌株の泳動像は、分子量約 300-6,000bp の間に約 4-17 本の泳動パターンが認められた。その中で 4,000-6,000bp の間に 2 本のバンドが認められたものが 21 株 (52.5%)、1 本のバンドが認められたものが 18 株 (45%)、バンドが認められなかったものが 1 株 (2.5%) であった。3,000~4,000bp に 3 本のバンドが認められたものが 3 株 (7.5%)、2

本のバンドが認められたものが 18 株(45%)、1本のバンドが認められたものが 12 株(30%)、バンドが認められなかったものが 7 株(17.5%)であった。2,000~3,000bp に 4本のバンドが認められたものが 1 株(2.5%)、3本のバンドが認められたものが 11 株(27.5%)、2本のバンドが認められたものが 14 株(35%)、1本のバンドが認められたものが 8 株(20%)、バンドが認められなかったものが 6 株(15%)であった。1,550~2,000bp に 3本のバンドが認められたものが 28 株(70%)、2本のバンドが認められたものが 8 株(20%)、1本のバンドが認められたものが 4 株(10%)であった。1,400~1,550bp に 3本のバンドが認められたものが 2 株(5%)、2本のバンドが認められたものが 12 株(30%)、1本のバンドが認められたものが 26 株(65%)であった。1,000~1,400bp に 3本のバンドが認められたものが 4 株(10%)、2本のバンドが認められたものが 12 株(30%)、1本のバンドが認められたものが 10 株(25%)、バンドが認められなかったものが 14 株(35%)であった。750~1,000bp に 3本のバンドが認められたものが 1 株(2.5%)、2本のバンドが認められたものが 10 株(25%)、1本のバンドが認められたものが 14 株(35%)、バンドが認められなかったものが 15 株(37.5%)であった。500~750bp に 2本のバンドが認められたものが 6 株(15%)、1本のバンドが認められたものが 16 株(40%)、バンドが認められなかったものが 18 株(45%)であった。400~500bp に 1本のバンドが認められたものが 6 株(15%)、バンドが認められなかったものが 34 株(85%)であった。200~300bp に 1本のバンドが認められたものが 1 株(2.5%)、バンドが認められなかったものが 39 株(97.5%)であった。

4. 供試菌株の RAPD-PCR 像の UPGMA クラスタ解析

供試菌株の RAPD-PCR 像をもとに UPGMA クラスタ解析を行ったところ、類似度 90%以上で 18 群に類別された。その中で、菌株No.26 と No.28 の類似度が 98.0%と最も高く、次に菌株No.15 と No.17 が 97.8%の値を示した。また、類似度が最も低い値は 68.5%であった。地域別では、鹿児島県の菌株No.41 と No.42 の類似度が 95.4%、栃木県の菌株No.7 と No.8 の類似度が 96.5%、岐阜県の菌株No.26 と No.27 の類似度が 92.3%、長野県の菌株No.10 と No.21 の類似度が 95.3%、北海道の菌株No.1 と No.3 の類似度が 91.9%を示し、それぞれ地域別によって高い類似性を示した。また、類似度 75%で分けると北海道グループ、関東甲信越地方と東海地方グループ、および中国地方グループの 3 群に類別された。

5. 培養法及び LAMP 法によるレジオネラ属菌の検出状況

培養法及び LAMP 法による 125 試料におけるレジオネラ属菌の検出状況をみると、両法で本菌が共通して検出された試料が 38 試料(30.4%)、また検出されなかった試料が 47 試料(37.6%)あり、合計 85 試料(68.0%)が両法の一致率であった。また、培養法陰性であったが LAMP 法陽性の試料が 38 試料(30.4%)あった。逆に培養法陽性で LAMP 法陰性の試料が 2 試料(1.6%)あった。これらのことから両法による検出状況に有意差($p < 0.01$)が認められた。すなわち、LAMP 法によりレジオネラ属菌を検出すると、危険倍率 0.303、相対危険度 0.526、寄与危険度 0.288 となり、検出率は培養法より高くなった。

6. 培養法により検出されたレジオネラ属菌

培養法によりレジオネラ属菌が検出された 40 試料の菌数分布をみると 10~40 CFU/100ml が 18 試料(45.0%)と最も多かった。次に 50~90 CFU/100ml、100~400 CFU/100ml および 1,000~4,000 CFU/100ml がそれぞれ 6 試料(15.0%)であった。なお、10CFU/100