

ml 未満(すなわち不検出)が 85 試料(68.0%)あったが、このうち選択培地上にレジオネラ属菌以外の細菌や真菌が早期に発育することにより、レジオネラ属菌の発育が確認できず、結果として陰性と判定された試料が 7 試料(8.2%)あった。分離された 49 株を同定したところ、42 株(85.7%)が *L. pneumophila* に同定され、他に *L. micadei* や *L. go-rmanii* がわずかながら同定された。また、*L. pneumophila* の血清型別では 1 群が 17 株(34.7%)と最も多く、次に 6 群が 8 株(16.3%)であった。その他、3 群、4 群、10 群に比較的多く型別された。

7. レジオネラ属菌数と LAMP 法によるレジオネラ属菌の検出状況

温泉浴槽水 125 試料について、LAMP 法によりレジオネラ属菌の検出を試みた結果を培養法による菌数分布と比較した。培養法で不検出(10 CFU/100ml 未満)の 85 試料のうち、LAMP 法では 38 試料(44.7%)が陽性を示した。また、培養法で 10~40 CFU/100ml のレジオネラ属菌が検出された 18 試料については、LAMP 法では 16 試料(88.9%)が陽性を示したが、2 試料(11.1%)は陰性であった。これら LAMP 法で陰性を示した 2 試料のレジオネラ属菌数はそれぞれ 10 CFU/100ml、30 CFU/100ml であり、分離された菌種はいずれも *L. pneumophila* であったが、血清型は不明であった。なお、50 CFU/100ml 以上のレジオネラ属菌が検出された 22 試料では、すべて LAMP 法陽性であった。

D. 考察

L. pneumophila の疫学的解析は、血清学的手法を用いて調査するのが一般的である。しかし、集団感染が生じた際には、患者由来株と環境由来株との同一性を明らかにすることが重要であるため、菌株間の差を詳細に識別できる PFGE 法の方が血清学的手法より優れた方法であるといわれる。最近、河野らが臨床由来株と温泉水由来株について PFGE 法を用いて分子疫学的解析を行い、感染源を特定している。

今回、著者らは都内で分離された *L. pneumophila* 1 群の臨床および環境由来株について Sfi I で酵素処理を行い、PFGE 法により泳動パターンの類似性を検討した。その結果、分子量およそ 50~850kbp の間に 5 本から 15 本のバンドが認められた。

Schoonmaker らが行った成績では、50~700kbp の範囲に 10 本から 15 本のバンドを認めており、低分子領域のバンドでは今回の成績と一致したが、高分子領域のバンドでは今回の方が 850kbp までバンドが認められた。

PFGE での泳動パターンから制限酵素断片長多型性解析(Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP)とクラスター解析を行ったところ、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との間には、明確な同一パターンは認められず、非常に多様な泳動パターンを示すことが明らかになった。冷却塔水由来株の RFLP では、450~500kbp の間に 2 本のバンドが認められたものが 23 株(92%)、350kbp に 1 本のバンドが認められたものが 17 株(68%)、600kbp に 1 本のバンドが認められたものが 16 株(64%)、350kbp、450~500kbp および 600kbp にバンドが認められたものが 12 株(48%)あった。これらにより冷却塔水由来では、分離場所が異なっても 350kbp、450~500kbp の間と 600kbp の位置にバンドが認められる傾向が高いと考えられた。クラスター解析において、冷却塔水由来では 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 64%であり、25 株中 14 株(56%)は類似度が 50%を示

し、比較的類似性が高いと考えられた。また、浴槽水由来株は 850kbp の位置にバンドが現れる株が多く認められることが明らかになった。しかし、臨床由来株と土壌由来株では、特定した位置にバンドは認められなかった。

PFGE による泳動パターンについて、渡辺らは *L. pneumophila* 1 群の臨床分離株 31 株および環境分離株 18 株の計 49 株について RFLP 解析を行い、泳動パターンがきわめて多様性に富むこと、臨床分離株と環境分離株が区別できるような特異的な DNA パターンは認められなかったことを報告している。

一方、木内らの報告では、冷却塔水と浴槽水からそれぞれ分離した *L. pneumophila* 1 群の泳動パターンの比較を行い、同一の採取場所から分離した菌株は同一パターンを示したが、血清群が同じでも採取場所が異なると泳動パターンは一致しなかった。これらのことから、今回供試した菌株は分離された場所がすべて異なるため、木内らが指摘しているように、泳動パターンが多様化していることが考えられた。また、*L. pneumophila* 1 群について RAPD-PCR 法を行い、泳動パターンを検討したところ、分子量 300~6,000bp の間に 4 本~17 本のバンドが認められた。その泳動パターンを解析したところ、90%以上の類似度では 18 群に類別され、多岐にわたっていたが、類似度 75%では地域ごとに 3 群のクラスターに分かれたことから、本菌の疫学的解析に応用できることが明らかとなった。

本法による解析は Bansal らが自然環境分離株の *L. pneumophila* 1 群について行っているが、200~5,000bp の間に 2 本から 15 本のバンドを認めている。今回の成績と比較すると、低分子領域のバンドでは今回は 300bp までしか認められなかった。また、高分子領域のバンドでは 6,000bp までバンドが認められ、Bansal らの報告とは異なった。

RAPD-PCR 法での泳動パターンをもとにクラスター解析を行ったところ、複数のバンドパターンが認められ、Bansal らの報告と同様に多型性のパターンを示した。しかし、*L. pneumophila* の全株に共通して特異的なバンドが 1,500bp と 4,000bp のところに認められることから、本菌の疫学的調査に RAPD-PCR 法が応用可能であることが示唆された。また、試験操作も簡単で、結果が一日で判明することから、迅速性が要求される疫学解析には有用であることが示された。さらに、類似度 75%で類別した 3 群のクラスター内では全株に共通したバンド以外に各クラスターごとに特異的なバンドが認められ、地域別によりパターンが異なることが明らかになった。一方、広く分子疫学的調査に用いられている PFGE 法は、*L. pneumophila* に対して泳動パターンがきわめて多様性を示し、操作も煩雑であることから、分子疫学的調査には不的確であることが報告されているが、今回検討した RAPD-PCR 法では、PFGE 法に比べてバンドパターンが特定な位置に認められることから、本法は有用であると考えられた。

レジオネラ属菌の検出方法において、一般的に用いられている培養法の最大の欠点は検査時間が長いことである。このため、迅速検査法の一つとして核酸の検出が普及しつつある。両法の相違点は、培養法では培地上に集落を形成できる生菌のみを対象とするのに対し、遺伝子検査法では、生菌に加え、死菌や培養不能(VNC)菌、さらに核酸のみでも検出可能である。したがって、培養法と遺伝子検査法の結果を完全に一致させることは困難である。

今回は 125 試料の温泉浴槽水について、従来の培養法と近年開発された LAMP 法によ

ってレジオネラ属菌の検出状況を比較検討したところ、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。なお、培養法で陽性を示し、LAMP法で陰性を示した2試料については、試料中に不溶性物質が多く、温泉浴槽水中に存在する増幅阻害物質の影響が考えられた。また、培養法によって不検出であった85試料のうち、LAMP法では38試料(44.7%)が陽性を示した。Ngらは冷却塔水のレジオネラ属菌検査において、培養法では検出されない試料でもPCR法では陽性を示す要因として死菌やVNC菌の存在を指摘している。温泉浴槽水においても同様な影響が考えられ、適切な塩素消毒が行われていても遺伝子検査法では陽性を示す場合がある。このことから、遺伝子検査法は培養法と異なり、陽性結果が即感染性の有無にはつながらない。すなわち、遺伝子検査陽性の温泉浴槽水が直ちに感染源になるとは限らない。この点が今後、遺伝子検査法をレジオネラ属菌の迅速検査法として採用する場合に十分考慮すべき課題である。

一方、塩素などの酸化性殺菌剤を添加した場合、死菌の核酸は分解され、殺菌剤濃度と接触時間によっては遺伝子検査法で不検出となることが報告されている。また、近年RNA迅速増幅技術として研究開発されているNASBA法やTRC法などが多分野で検討されている。こうした技術の導入により遺伝子検査と培養法による結果を近づけることが可能になるであろう。

E. 結論

以上のことから、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。こうしたなかで泳動パターンが一致することは両菌株が同一由来で、しかも同時期に生息していたことを強く示唆するものであり、疫学的調査には重要な情報になるものと考えられた。また、今回検討したRAPD-PCR法は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、疫学的調査方法の一つとして有用であった。今後は分離菌株を増やし、遺伝子学的解析の基礎データを蓄積することによってさらに詳細な検討を行い、疫学的解析に応用されることが期待される。さらに、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。しかしながら、遺伝子検査法では検出原理が培養法と異なるため、LAMP法の陽性が必ずしも感染の危険性を示していることにはならない。この点が今後、遺伝子検査法をレジオネラ属菌の迅速検査法として指針に採用する場合、十分考慮すべき課題である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Furuhata, K., Annaka, T., Ikedo, M., Fukuyama, M., Yoshida, S. : Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and conventional culture for

thedetection of Legionella species in hot spring water samples in Japan.
Biocontrol Sci., 10:117-120(2005)

- 2) 斎藤優子、小澤一弘、小林崇良、久保亮一、古畑勝則：安全性を配慮したレジオネラ属菌検査用 GVPN 培地の性能. 用水と廃水、47：716-720(2005)
- 3) 古畑勝則：レジオネラ症感染防止対策に関する研究(研究奨励賞受賞論文). 防菌防黴誌、33：397~406(2005)
- 4) 古畑勝則：温泉水におけるレジオネラ汚染とその対応. 水環境学会誌、28：559-563(2005)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) Furuhashi, K., Dogasaki, C., Hara, M., Fukuyama, M. : Inactivation of Legionella pneumophila from whirlpool bath water by grapefruit (Citrus paradisi) seed extract. Biocontrol Sci., 8: 129-132(2003)

2. 学会発表

- 1) 古畑勝則：レジオネラ症感染防止対策に関する研究(研究奨励賞受賞講演). 日本防菌防黴学会第 32 回年次大会(2005. 5)大阪.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 古畑勝則、福山正文：全国各地の温泉水におけるレジオネラ属菌の生息状況. 第 19 回日本環境感染学会(2004. 2)横浜.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Legionella pneumophila の病原性と消毒に関する研究

分担研究者 宮本 比呂志 (佐賀大学医学部・病因病態科学)

研究協力者 吉村 博子 (産業医科大学医学部・微生物学)

研究要旨

生活環境におけるレジオネラ感染予防のためには環境から分離されるレジオネラが病原性を持っているか否かを迅速に知ること、および病原性のレジオネラが検出された場合は早急に消毒殺菌することが重要である。そこで、分担研究者は、レジオネラの病原性と消毒の2つに関して平成15年度から17年度にかけて研究を行った。

病原性に関しては(1) *L. pneumophila* 弱毒株が強毒株に変換(病原変換)することを見だし、その機序が染色体上の病原遺伝子の接合伝達であること

(2) 1986年より2004年にかけて分離された215株の *L. pneumophila* 環境分離株の病原性を調べた結果、すべての水環境分離株が病原性を持っていること

(3) 生きていますが培養法で検出できない塩素損傷菌は病原性を失っていることを明らかにした。これらの結果は、*L. pneumophila* の病原性は変化する可能性があるけれど、人工水環境から *L. pneumophila* が分離培養された場合には全て病原株と考え、その水環境の衛生管理を徹底することが望ましいことを示している。また、培養法で検出できない状態の塩素損傷菌が病原性を失うという知見は、「培養検査法は病原株の数を数える定量法である」という研究者の主張を裏付けており、浴槽水における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支持している。

一方、消毒に関しては(1) 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(2) その消毒殺菌には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、貯湯槽の清掃、および給湯温度を上げて維持管理することが安価で有効であること(3) 浴槽水の消毒に推奨されている塩素の消毒効果は高pHになるほど低下すること(4) 塩素消毒により菌が損傷を受け、生きていますが培養できない状態に陥ること(塩素損傷菌の存在)などを明らかにした。これらの結果により、病院給湯設備のレジオネラ汚染の状況と高温消毒法の具体的な手順を示した。また、塩素損傷菌が培

養能を回復することを明らかにし、一時的でなく継続的な塩素濃度の維持管理が必要なことを提案した。

A. 研究目的

生活環境におけるレジオネラ感染予防のためには環境から分離されるレジオネラ属菌が病原性を持っているか否かを迅速に知ること、および病原性のレジオネラが検出された場合は早急に除菌・消毒することが重要である。そこで、分担研究者は、レジオネラの病原性と消毒の2つについて研究を行った。

病原性に関しては（1）レジオネラの病原性は安定して保持されているのか、それとも変わるのか（**病原変換に関する研究**）（2）環境から分離されるレジオネラはすべて病原性をもっているのか、それとも一部のレジオネラだけが病原性を保有しているのか（**環境分離株の病原性評価に関する研究**）（3）生きているが培養法で検出されないレジオネラに病原性があるのかどうか（**塩素損傷菌の病原性に関する研究**）の3点を明らかにすることを目的とした。

消毒に関しては、レジオネラ症の25～45%が院内感染で、その主な感染源は病院給水・給湯設備であること、また、浴槽水の消毒に推奨されている塩素系薬剤はアルカリ領域で消毒効果が減弱すると報告されていることの2点に着目し（1）病院給湯設備のレジオネラ汚染の状況を示し、その効果的な消毒除菌法を提案すること（**病院給湯設備のレジオネラ除菌に関する研究**）（2）アルカリ領域での塩素の消毒効果を具体的に示すこと（**アルカリ領域での塩素の消毒効果に関する研究**）の2点を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

I. 病原性に関する研究

（病原変換に関する研究）

トランスポゾン Tn903lacZdII により *L. pneumophila* Philadelphia-1（血清群1、強毒株）の染色体上にカナマイシン（Km）耐性遺伝子と lacZ 遺伝子を導入した株を作製した。この株と *L. pneumophila* Chicago-2（血清群6、ストレプトマイシン[Sm]耐性、細胞内増殖能欠損株、弱毒株）を使用して接合伝達実験を行なった。Km 耐性、lacZ(+), Sm 耐性になったコロニーを組換え体と考え、コロ

ニー数を数え、ドナーあたりの伝達頻度を計算した。組換え体の遺伝型別、表現型別、アメーバ内増殖能、細胞内増殖能を調べ、最終的にモルモットへの吸入曝露実験を行って、菌の病原性の変化を調べた。

(環境分離株の病原性評価に関する研究)

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 *L. pneumophila* 215株を供試菌とした。供試菌の由来は冷却塔水、浴槽水、給湯水、シャワーヘッド内停滞水、噴水でそれぞれ27、170、4、2、12株であった。それらの血清群は1から10までの全てにわたっており、順に56、5、30、17、42、53、2、3、2、5株であった。アメーバ寒天法は以前に報告した方法(感染症誌 2003; 77: 343-345)で行い、2度繰り返し結果の再現性を確認した。

(塩素損傷菌の病原性に関する研究)

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。なお、生菌数は下記のCFDA染色により数えた。

II. 消毒に関する研究

(病院給湯設備のレジオネラ除菌に関する研究)

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行った。合計52箇所延べ119回の培養検査と必要に応じてPCR法やパルスフィールド電気泳動法を行った。また、除菌対策費用を給水量と灯油使用量より算出し、除菌対策の前後で比較した。

(アルカリ領域での塩素の消毒効果に関する研究)

L. pneumophila JLP1087 を pH 8.0 から pH 10.0 に調整したリン酸緩衝液に約 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 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

(このとき、試験液の塩素濃度は約 0.5 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 の塩素溶液も作成して接触試験を行った(このときは、試験液の塩素濃度はそれぞれ約 1.0 と 2.0 ppm)。これらの試験液は 40℃ で 31 分まで静置した。塩素接触静置中に 2 分または 5 分間隔で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。必要に応じてエチジウムブロマイドと CFDA による 2 重染色を行い、全菌数(エチジウムブロマイド陽性菌数)と生菌数(CFDA 陽性菌数)を測定した。

C. 研究結果

I. 病原性に関する研究

(病原変換に関する研究)

ドナーあたり約 10^{-6} の頻度で組換え体が出現した。遺伝型別、表現型別により、ドナーは強毒株である Philadelphia-1 株で、レシピエントは弱毒株である Chicago-2 株であった。組換え体の 2.8% は細胞内増殖能を回復しており、モルモットに Philadelphia-1 株と同様の激しい肺炎を惹起した。これらの結果は *L. pneumophila* は染色体 DNA の接合伝達システムを保有しており、これにより弱毒株が強毒株に変換することを示している。

(環境分離株の病原性評価に関する研究)

水環境より分離された 215 株は全てアメーバ寒天培地上に集落を形成した。病原株である Philadelphia-1 株と臨床分離株 18 株も全てアメーバ寒天培地上に集落を形成したが、弱毒株である 25D は集落を形成することが出来なかった。これらの結果は水環境より分離された全ての *L. pneumophila* は病原株であることを示している。

(塩素損傷菌の病原性に関する研究)

発熱の有無を一週間観察したが、いずれのモルモットも発熱しなかった。培地での増殖能を失った損傷菌は生菌であるが、病原性を失っていることが示唆された。

II. 消毒に関する研究

(病院給湯設備のレジオネラ除菌に関する研究)

一年間にわたり、合計 52 カ所 (のべ 119 回) のレジオネラ培養検査を行なった。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の 3 者併用が有用であった。また、除菌対策費用を給水量と灯油使用量より算出し、除菌対策の前後で比較したところ、給湯水使用量が除菌対策後には前に比べ約 12% 減少したため、給湯ボイラーの灯油使用量は減少していた。給湯温度を上げたにもかかわらず水道料金および灯油料金の負担が増えることはなかった。

(アルカリ領域での塩素の消毒効果に関する研究)

pH8.1、遊離残留塩素濃度 0.47ppm では 11 分で菌は検出限界以下 (10CFU/mL 未満) に殺菌された。pH8.5、遊離残留塩素濃度 0.58 ppm では 13 分で菌は検出限界以下 (10 CFU/mL 未満) に消毒された。しかし、pH9.2、遊離残留塩素濃度 0.58 ppm の条件では 11 分でも約 10^3 CFU/mL の菌が生残しており、pH8.1 や 8.5 の場合に比べ消毒能の低下が示された。但し、塩素濃度を 0.99 ppm に保てば 11 分で検出限界以下に殺菌された。pH10.0、遊離残留塩素濃度 0.46ppm では検出限界以下に消毒するためには 31 分を必要とした。塩素濃度を 1.04ppm に上げた場合は 27 分で検出限界以下に殺菌されたが、塩素濃度をその約 2 倍の 1.92ppm にあげても 15 分で約 10^3 CFU/mL の菌が生残した。

高 pH では塩素が効きにくいことが培養法で確認されたが、塩素接触時間が長くなるほど減少すると予測された CFU が、一時的に増加する現象がいずれの条件でも観察された。このことは塩素消毒によりレジオネラが生きているが培養できない損傷菌に陥ることを示唆している。

そこで、pH9.0 遊離残留塩素濃度 0.7 ppm の条件で接触試験を 30 分間行い、全菌数 (生菌数+死菌数)、生菌数、培養可能菌数を測定した。その結果、15 分から 19 分にかけて菌は一時的に培養できない状態に陥るが、 10^4 cells/mL 程度の菌が生残しており、21 分から 29 分にかけて一部の菌が培養可能な状態に回復することが明らかとなった。しかし、31 分後にはすべてが死菌になった。

D. 考察

I. 病原性に関する研究

各種のレジオネラ検出法が開発され、感度、特異性、操作性、所要時間、費用を基準にしてそれぞれの検査法の優劣が論じられてきた。レジオネラは病原細菌であるにも拘わらず、その検出法が病原株を検出する方法であるか否かという観点から評価は未だなされていない。*L. pneumophila* の病原性は染色体 DNA の接合伝達により変わる可能性があるものの、水環境より分離培養された *L. pneumophila* は全て病原株であるという結果は、「培養検査法は病原株の数を知る定量法」であることを示唆している。培養検査で検出できない塩素損傷菌は生菌であるが、病原性を失っているという知見も「培養検査法は病原株の数を知る定量法」であることを裏付けている。同一の水環境に強毒株と弱毒株がアメーバとともに共存・棲息している場合、強毒株の方がアメーバ内で増殖出来るため弱毒株に比べて環境水中での菌数が多くなることが予測される。その結果、培養法では優占株である病原株が検出されやすくなると推察される。生きているが培養できない状態の *L. pneumophila* をアメーバと共培養することで集落形成能を回復させると、その株は病原性を持つことが報告されている。これは培地上での集落形成能がヒトへの病原性と密接に関連することを示しており、今回の知見を支持している。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。

II. 消毒に関する研究

我が国では病院給湯水のレジオネラ汚染に関する報告が非常に少なく、その実態さえよくわからない状況にある。今回の調査・除菌対策実施期間中に合計 52 カ所で検査が行われ、15 カ所 (29%) から汚染が検出された。レジオネラ汚染が見つかりやすい湯待ち時間が長く、湯温の低い給湯栓を選んでの調査であったので、この汚染率は病院給湯設備全体の汚染率を示しているわけではないが、貯湯槽水の汚染は設備全体の汚染につながるため最も深刻な問題と思われた。また、末端給湯水の汚染の最大の原因が給湯水の停滞であることはよく知られているが、一旦汚染がおこると汚染給湯栓局所での通常の給湯温度 (55℃程度) での放水作業では除菌は困難で、昇温循環と放水作業が必要である。循環ループ内の給湯水の昇温循環だけでは不十分で、放水作業により枝管内の停滞水を排出することが汚染の防止と除菌に重要と考えられた。病院内で給湯水の停滞

がおこりやすい施設・場所は特別浴槽シャワーヘッド、医師当直室、外来診療部門、放射線部撮影室であることが判明した。これらの場所は使用頻度が極端に少ない給湯栓が多数あり、湯待ち時間が長く、湯温の低い給湯栓も多かった。これらの給湯栓では定期的な放水作業による汚染防止がもっとも重要と考えられる。また、これらの場所はレジオネラの末端汚染を定期的に監視する採水場所として有用で、汚染監視の基準点に最適と考えられる。末端給湯栓の汚染が施設全体の汚染につながる中央循環式の給湯設備では貯湯槽の維持管理に加えて停滞水の防止が非常に重要と思われる。消毒除菌対策として給湯水の 75℃での昇温運転（24 時間）と末端給湯栓類からの放水作業、そして貯湯槽の清掃を行った。それらに加え、貯湯槽水の設定温度を 4℃上げて 66℃で維持管理した。このことにより前年度に比べて水道料金や灯油料金の負担が増えることが予想されたが、負担増は無かった。これは給湯水の利用量が減ったことに起因していた。今回の除菌法は病院全体としての費用負担の増加もなく実施できるもので非常に有効であった。

現在、浴槽水の消毒には塩素系薬剤を使用することが推奨されている。一方、塩素系殺菌剤の殺菌能は高 pH になるほど低下することが一般に知られている。しかし、アルカリ領域におけるレジオネラ消毒効果についての報告はきわめて少ない。今回の研究によりレジオネラに対する塩素の殺菌能は高 pH になるほど低下することが確認された。興味あることに、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。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」ことに起因していた。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（上述）。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、培養法で不検出という検査結果から、塩素消毒を中断すると、このような損傷菌が培養可能状態に回復する可能性を示唆している。塩素消毒は単回施行では不十分であり、連続的に行って塩素濃度を継続的に維持する必要があると考えられる。

健康危険情報

該当無し

研究発表

1. 論文発表

Virulence conversion of *Legionella pneumophila* by conjugal transfer of chromosomal DNA、 2003. J. Bacteriol. 185(22): 6712-6718.

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.

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.

レジオネラの病原性発現機構
Mebio 2004; 21(12): 63-68.

レジオネラ症 Update 菌側からみた新しい展開 -レジオネラのゲノム解読からみえてきたもの- 臨床と微生物 32 (7) 6-12 2005年7月

レジオネラ 微生物感染学 (光山正雄編) 169-177 南山堂 2005年11月

レジオネラはどうやってヒトの細胞の中で生き延びるのか 最新医学 61 (2) 印刷中 2006年2月

2. 学会発表

レジオネラのマクロファージ侵入と細胞内動態に関する遺伝子と機能
第77回 日本細菌学会総会 シンポジウム4:細菌成分と宿主の分子の interaction、平成16年4月、大阪

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

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

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

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

土壌より分離された *Legionella* 属の新菌種と思われる4菌株について
第78回日本細菌学会総会 平成17年4月 東京

中央循環式の給湯設備のレジオネラ汚染とその除菌
日本防菌防黴学会 第32回年次大会 平成17年5月 大阪

特別セミナー「レジオネラの病原性発現機構」
Bacterial Adherence & Biofilm 第19回学術集会 平成17年7月 北九州

知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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

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

レジオネラ症の主要原因菌種である *Legionella pneumophila* の生態および感染宿主内での挙動などその生活環・感染サイクルを考えあわせ、菌の宿主細胞への感染性とそれらに影響を及ぼす菌体因子に関する以下の3つのテーマ；

- 1) *L. pneumophila* のストレス蛋白発現と宿主細胞内増殖性との相関に関する研究
- 2) *L. pneumophila* 新規細胞内増殖制御因子の同定及び機能解析
- 3) *L. pneumophila* 新規病原因子の探索研究

で研究を遂行し、レジオネラの性質特に病原性及び病原機構に関する検討を行なった。

1)では、*L. pneumophila* は、自然環境宿主であるアメーバ内及び感染宿主であるヒトマクロファージ内におけるストレス応答の違いを明らかとした。また、細胞内増殖不全株は *in vitro* 培養性状に関して野生株と遜色ないにも関わらず、マクロファージ感染において感染直後から全菌体蛋白質合成の停止を強いられる現象を示した。

2)では、アメーバ及びマクロファージ両宿主内において菌の増殖性を制御する新たな菌体因子 PmiA を同定した。

3)では、2D-DIGE (2 Dimensional Differential Image Gel Electrophoresis) システムを用いて、*L. pneumophila* の新たな病原因子を探索し、いくつかの候補となる菌体因子を検出した。

A. 研究目的

L. pneumophila は、自然環境中では、アメーバなどの原生動物内に寄生・増殖し、また、感染宿主内においては、マクロファージなどの食細胞内で宿主免疫システムによる攻撃に抵抗し増殖するシステムを保持する細胞内寄生細菌である。その際、菌にとって感染に伴う急激な環境変化や、宿主の多彩な防御免疫機構は大きなストレスとなり、それら乗り越えるにはストレス蛋白質の防御機構が不可欠であると推測される。また、*L. pneumophila* は、タイプ IV 分泌装置をコードする遺伝子群 *icm/dot* (intracellular multiplication/defect in organelle trafficking) を保有する。Icm/Dot 分泌装置は、宿主と相互作用する菌体由来のエフェクター分子を宿主細胞内へ送達し、菌を含むファゴソームのリソソームとの融合を阻害するなど、菌自身を取り巻く細胞内環境を巧みに調節することにより、菌の宿主内増殖を可能にすると考えられ、病原性に深く関与すると推測されている。一方、感染に伴うストレス応答と病原性との関連を追究した解析はこれまで極僅かで、特に *icm/dot* などの他の因子との病原ネットワークを明らかにした報告は皆

無である。また、Icm/Dot を含む現在までに明らかにされた病原因子のみでは、*L. pneumophila* の病原メカニズムの包括的な説明はできないのが現状である。

本研究では、代表的な分子シャペロン Hsp60、DnaK などを含むストレス蛋白の *in vivo* 及び *in vitro* における発現に関して、*icm/dot* 及び細胞内増殖性との相関について調べた。

また、*L. pneumophila* ゲノムへの mini-Tn10::kan 挿入により作製したアメーバ内及びマクロファージ内の増殖性が低下した *pmi* (protozoa and macrophage infectivity) 変異株 GB112 について、その性状及び変異遺伝子に関する詳細な解析を行い、*L. pneumophila* の細胞内増殖性に関与する新たな菌体因子の同定及びその機能の解明に取り組んだ。

さらに、2D-DIGE (2 Dimensional Differential Image Gel Electrophoresis) 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

菌株及び細胞株の培養

L. pneumophila 菌株の培養は、charcoal-yeast extract (CYE) 培地または acs yeast extract (AYE) 液体培地で行った。ヒト由来マクロファージ様細胞 U937 の培養は、10%FBS 含有 RPMI1640 を用いた。マクロファージへの分化誘導は、PMA にて行った。アメーバ *Acanthamoeba polyphaga* の培養は、PYG (protease peptone yeast extract) 液体培地を用いた。

細胞内増殖性試験

細胞 (1×10^5 cells) に対して、対数増殖後期の *L. pneumophila* 各菌株 (1×10^6 bacteria) を、37°C で 1 時間感染させた (MOI=10)。細胞外の菌はゲンタマイシン (Gm) 処理にて除去した。所定の時間培養後、段階希釈した細胞溶解液を CYE 培地上に接種し、発育したコロニーを計数することにより、細胞内増殖菌数を算出した。

<B1. *L. pneumophila* のストレス蛋白発現と宿主細胞内増殖性との相関に関する研究>

B1-1. 様々な *in vitro* ストレス負荷による *L. pneumophila* ストレス蛋白質発現の解析

対数増殖中期で、42°C の熱ストレス、 H_2O_2 による酸化ストレス、NaCl、KCl、glycerol による浸透圧ストレスを負荷した *L. pneumophila* の発現蛋白質を ^{35}S による放射性標識後、SDS-PAGE にて解析した。また、免疫沈降法による DnaK の検出は、プロテイン G-アガロース及びウサギ抗大腸菌由来 DnaK ポリクローナル抗体 (京都大学ウイルス研究所 和田千恵子博士より御恵与) を使用して行った。

B1-2. 菌体ストレス蛋白の画分化

対数増殖中期で 42°C の熱ストレスを負荷した *L. pneumophila* の全菌体蛋白質を ^{35}S 標識し、超遠心法にて細胞画分ごとに菌体蛋白質を分離抽出した。

B1-3 宿主細胞内における *L. pneumophila* ストレス蛋白発現プロファイルの解析

細胞に対数増殖後期の *L. pneumophila* 各菌株を一定の MOI で 1 時間感染させた。未感染菌の除去および宿主蛋白合成阻害のため、cycloheximide 及び Gm 含有

RPMI1640-10%FBS を加え、37°Cで 12 時間培養した。感染細胞培養上清に Tran³⁵S-Label を加え、37°Cで 2 時間培養することで、菌体蛋白質を放射標識し、SDS-PAGE にて解析した。

B1-4. 免疫蛍光染色による U937 内における *L. pneumophila* DnaK 発現の検出

L. pneumophila DnaK は、本研究室で作製したウサギ抗 *L. pneumophila* DnaK ポリクローナル抗体/Alexa546 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM-510 にて観察した。

B1-5. *L. pneumophila* の β -Galactosidase (β -Gal) 発現誘導試験

tac プロモーターによる β -Gal 発現系を組み込んだプラスミド pAB1 を導入した *L. pneumophila* 株を使用して、*in vitro* 培養および感染マクロファージ内における β -Gal 発現をその酵素活性をモニターすることにより調べた。

<B2. *L. pneumophila* 新規細胞内増殖制御因子の同定及び機能解析>

B2-1. *L. pneumophila* 感染による細胞毒性試験

U937 細胞に関しては、Alamar Blue (Biosource) を使用して行なった。*A. polyphaga* に関しては、トリパンブルーを使用して行なった。

B2-2. 免疫蛍光染色による *L. pneumophila* 感染 U937 細胞における細胞内小器官リクルートメントの観察

細胞外の菌をウサギ抗 *L. pneumophila* ポリクローナル抗体/Alexa546 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体、細胞内の菌を TO-PRO-3、細胞内小器官をマウス抗ヒト LAMP-1/LAMP-2 モノクローナル抗体あるいはマウス抗 KDEL モノクローナル抗体/Alexa488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

B2-3. 透過型電子顕微鏡による *L. pneumophila* 感染 *A. polyphaga* でのファゴソーム-リソソーム融合の観察

感染細胞試料を固定後、酸性ホスファターゼの基質 β -glycerolphosphate で処理した。再度固定後、エタノールで脱水処理を行い、Eponate 12 resin にて包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウラニル、クエン酸鉛で切片を染色後、Hitachi H-7000/STEM electron microscope (Hitachi) にて観察した。

B2-4. GB112 株の変異遺伝子の特定と相補株の作製

mini-Tn10::kan の半領域とそれに隣接した GB112 株ゲノム領域をクローン化したプラスミド (pB-3) を鋳型とし、T7 又は T3 プライマーを用いてサイクルシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。得られた塩基配列情報をコロンビアゲノムセンター Legionella Genome Project のデータベース上で Blast 検索し、決定した塩基配列と一致する遺伝子を検索した。また、特定した遺伝子領域 (*pmiA*) を pBC-SK⁺ベクターにクローニングした組換えプラスミドを、GB112 株へエレクトロポレーションにより導入し、得られた菌株を相補株 GB112C-5 とした。

B2-5. *pmiA* の *Legionella* 属菌種における普遍性

Legionella 属菌種各菌株のゲノム DNA を抽出し、*pmiA* プロンプを使用したサザンハイブリダイゼーションにより調べた。

B2-6. NaCl 感受性試験

対数増殖期 *L. pneumophila* 各菌株培養液を、CYE 平板培地及び 0.6% NaCl 含有 CYE

平板培地に接種し、発育したコロニー数を計測し、NaCl 感受性を評価した。

B2-7. 接触依存性赤血球溶血試験

羊赤血球 (sheep red blood cells, sRBCs) 溶液に *L. pneumophila* 各菌株培養液を加え、赤血球と菌を2時間接触させた。上清中のヘモグロビンを OD₄₁₅ で測定することにより、各菌株の溶血活性を評価した。

<B3. *L. pneumophila* 新規病原因子の探索研究>

B3-1. 二次元電気泳動

対数増殖期 (菌培養液吸光度 OD₆₀₀=1.6) 及び対数増殖後期 (菌培養液吸光度 OD₆₀₀=3.8) *L. pneumophila* JR32 株の菌体蛋白質を Cy3 及び Cy5 でそれぞれ標識した。

Immobiline DryStrip pH3-10NL, 24cm (Amersham) 及び Ettan IPGphor を使用して、二次元目電気泳動を行なった。泳動終了後、ゲルを Typhoon 9400D (Amersham) でスキャンし、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。

B3-2. 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) を用いてゲルから切り出した。

B3-3. 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・濃縮後、分析試料とした。

B3-4. 蛋白質の同定

MALDI-TOF MS (ultraflex : Bruker) を用いて試料の質量分析を行った。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 (NCBI nr) 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

<C1. *L. pneumophila* のストレス蛋白発現と宿主細胞内増殖性との相関に関する研究>

C1-1 熱ショックによる *L. pneumophila* ストレス蛋白発現プロファイル

野生株 JR32 に 42°C、30 分間の熱ショックストレスを負荷した場合、熱ショックストレス非負荷時に比べ、74kDa の DnaK 及び 59kDa の Hsp60 と推測されるものを含む様々な蛋白質の発現の増加が認められた。74kDa の蛋白バンドは、*E. coli* DnaK 抗体による免疫沈降によって検出され、DnaK であると断定した。

C1-2 野生株及び細胞内増殖不全株におけるストレス蛋白の発現プロファイル及びその局在の比較

JR32 と細胞内増殖不全株 LELA3118 (*dotA* 変異株) 及び LELA3473 (*icmR* 変異株) の熱ショックによるストレス蛋白発現を比較したところ、それらの蛋白発現プロファイルに違いは認められなかった。さらに、菌体蛋白を細胞外分泌画分、膜画分及び細胞質画分に分離した。74kDa の DnaK のバンドは細胞質画分に現れ、株間で局在の相違はなかった。59kDa の Hsp60 は、熱ショックを負荷しない場合細胞質画分に局在するが、熱ショックを与えた場合いずれの菌株においても発現量の増加と共に膜画分に、さらに JR32 では分泌画分においてもその発現が観察され、局在の変化がみられた。また、JR32 の細胞外分泌画分において、熱ショックにより発現が誘導される約 50kDa 及び 78kDa の 2 つのバンドが観察され、これらのバンドは自然突然変異性細胞内増殖不全株 25D 及び LELA3118 では発現が極めて弱く、ほとんどみられなかった。これらの蛋白の同定は本研究では行なわなかった。

C1-3 *L. pneumophila* 病原株及び非病原株の宿主内発現蛋白プロファイルの比較

U937 内において、JR32 は *in vitro* での熱ショック負荷時よりも強く DnaK 及び GroEL をはじめとしたストレス蛋白発現の誘導が観察されたが、25D 及び LELA3118 の場合は、それらの発現が全くみられなかった。これは、細胞内 *L. pneumophila* による DnaK 発現の免疫蛍光染色による観察でも同様な結果が得られた。

一方、アメーバ内における JR32 のストレス蛋白発現は、U937 内に比して非常に弱く、放射活性を同じくして泳動した 25D 及び LELA3118 ではさらに弱く、その発現がほとんど認められなかった。

C1-4 宿主内における *L. pneumophila* の蛋白合成能

プラスミド pAB1 を導入した JR32、25D 及び LELA3118 の試験管培養において、IPTG の添加によりいずれの株も β -Gal の強い発現誘導がみられた。しかしながら、これらの菌株の U937 細胞内での β -Gal 発現誘導能を調べた結果、JR32/pAB1 では感染初期からその発現誘導がみられ、経時的に発現量が増加したが、25D/pAB1 及び LELA3118/pAB1 では感染後一貫して発現量が著しく少なく、12 時間後では全く発現が認められなかった。

<C2. *L. pneumophila* 新規細胞内増殖制御因子の同定及び機能解析>

C2-1. 細胞毒性及び細胞内増殖性

U937 細胞及び *A. polyphaga* に対する細胞毒性に関して、野生株 AA100 が 85%以上の細胞毒性を示すのに対して、GB112 株は 20%以下の値を示し、著しい細胞毒性の低下が見られた。また、GB112 株の細胞内増殖性に関して、U937 細胞においては、感染 24 時間以降 48 時間まで野生株の約 1/10 程度の低下が見られた。しかしながら、*A. polyphaga* においては、感染後 4 時間ですでに極端な細胞内菌数の減少が起こり、感染後 24 時間で完全に殺菌された。

C2-2. *L. pneumophila* 感染 U937 細胞の細胞内小器官リクルートメントについて

U937 細胞内の GB112 株を含むファゴソームには、後期エンドソーム-リソソームマーカー LAMP-1 及び LAMP-2 のシグナルが高率に見られた (感染 4 時間後)。一方、小

胞体である KDEL シグナルが局在する割合は野生株の場合と比較して低かった(感染 6 時間後)。よって、U937 細胞における GB112 株含有ファゴソームでは、感染初期にリソソームとの融合が起こり、野生株感染時に見られる小胞体の共局在が起こる割合が低いことが示唆された。

C2-3. *L. pneumophila* 感染 *A. polyphaga* におけるファゴソーム-リソソーム融合

A. polyphaga 感染における GB112 菌を含むファゴソーム内のリソソーム酵素酸性ホスファターゼの局在を評価したところ、ファゴソームの酵素含有率が著しく高いことがわかった (感染 6 時間後)。よって、*A. polyphaga* の GB112 株含有ファゴソームも、感染初期にリソソームとの融合が起こることが明らかとなった。

C2-4. 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

GB112 株の mini-Tn10::kan 挿入領域の塩基配列解析を行った結果、915bp の大きさを持つ ORF (ORF915, lpg1728) 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五つの ORF (*ugpA*, *ugpE*, *ugpC*, *lpg1727*, *yafH*) が存在した。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 の遺伝子相補株 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、野生株とほぼ同様な性状に回復した。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。

C2-5. *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。

C2-6. 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。

C2-7. GB112 株及び *icm/dot* 変異株の性状比較

膜貫通型蛋白であると予測された PmiA と、菌体膜上でタイプ IV 分泌装置を形成する *L. pneumophila* の代表的な病原因子 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。

(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、sRBCs を用いて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。

(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が、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。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。

<C3. *L. pneumophila* 新規病原因子の探索研究>

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 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。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、ケトン体生成やポリヒドロキシ酪酸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、*in vitro* 培養では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唆した。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。

D. 考察

本研究では、*L. pneumophila* のストレス蛋白発現に関して、感染宿主であるマクロファージ内においては様々なストレス蛋白の発現が見られた一方、自然宿主であるアメーバ内ではそれらの発現が非常に弱いことを示した。このことは、自然環境中における *L. pneumophila* のリザーバーであるアメーバ内が菌にとってストレスが少ない環境であり、一方、マクロファージ内では宿主免疫による殺菌機構がはたらき、それらの攻撃に