

抵抗するために、菌自身が多くのストレス蛋白を発現することを示唆するものと推察される。一方、細胞内増殖不全株では感染直後より菌を含むファゴソームとリソソームとの融合が起こり、より強いストレス条件に曝露されることにより、ストレス蛋白を含む全菌体蛋白合成能が著しく低下し、細胞内増殖が抑制されると考えられる。この時、菌は細胞内において増殖しないが、少なくとも感染 12 時間後までは、ほとんど死滅することなく生存していることが明らかとなった。*L. pneumophila* のマクロファージ感染において、エフェクターのひとつである RalF は、菌が宿主に接触する際に細胞内に注入される事が示されており、*L. pneumophila* 感染特異的なファゴソーム形成に関わる宿主内シグナル伝達はこの時点から開始されると推測されている。今回示した細胞内増殖不全株が感染直後から全菌体蛋白合成の停止を強いられる現象は、エフェクターの宿主内輸送能を喪失しているこれら菌株が、宿主免疫による殺菌攻撃を回避できる *L. pneumophila* 特異的なファゴソームを形成できないことに起因すると考えられる。

L. pneumophila のアメーバ及びマクロファージ両宿主内増殖を制御する新規菌体因子 PmiA を同定した。PmiA は、構成アミノ酸配列より 3 回膜貫通型蛋白質であると推測され、その中央に特徴的な広い親水性領域を保持する。この部分は、*L. pneumophila* と同じく TypeIV 分泌装置を有する *Helicobacter pylori* や細胞内寄生性の *Rickettsia* 属菌に保持される hypothetical protein の一部のアミノ酸配列と高い相同性を示し、このことは菌の病原性発現に関わる機能を考える上で非常に興味ある知見である。一方、今回明らかとなった PmiA の孔形成活性は、Icm/Dot 以外に本活性に関与する因子が示された初めての例であるが、感染系においてどのように機能しているかは不明である。今後、細胞内増殖を制御する膜局在型の菌体因子として、PmiA が Icm/Dot タンパク複合体の構成因子である可能性も含め、Icm/Dot との機能の異同を明確にし、PmiA の病原性に関わる詳細な機能を追究する予定である。また、*pmiA* 変異株は、特にアメーバ内において著しい増殖性の低下を示した。*L. pneumophila* の自然環境中での増殖の場がアメーバなどの原生動物であること、さらには *pmiA* 遺伝子が本研究で調べたレジオネラ属菌の中で *L. pneumophila* のみに特異的であったことを考えあわせると、PmiA あるいはアメーバ内の相互作用分子をターゲットとした機能阻害薬が、新たなレジオネラ感染防御策として有効である可能性が考えられる。今後それらの探索、開発、有効性及び活用に関しても検討していきたい。

2-D DIGE システムを用いたディファレンス解析では、*L. pneumophila* 野生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蛋白質を同定したが、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は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。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。また、既知の蛋白質と相同性を示さない hypothetical protein もいくつか同定され、これらも併せて、今回同定した因子の生物学的機能を明らかとした上で、今後その病原因子としての可能性を追究したい。

E. 結論

<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>

- 1) *L. pneumophila* の *in vitro* ストレス条件下におけるストレス蛋白誘導とその局在は、野生株及び細胞内増殖不全株で差がない。
- 2) ヒトマクロファージ内において、野生株では多くのストレス蛋白発現がみられたが、細胞内増殖不全株ではそれらの発現が抑制されていた。一方アメーバ内では、野生株においてもストレス蛋白発現は非常に弱く、これらの結果は感染宿主内と自然宿主内では菌を取り巻く環境が大きく異なることを示唆した。
- 3) マクロファージ内で野生株は盛んに蛋白合成を行なうのに対して、細胞内増殖不全株は感染直後からストレス蛋白のみならず全菌体蛋白の合成が阻害されることを明らかとした。

<L. pneumophila 新規細胞内増殖制御因子の同定及び機能解析>

- 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* 属内で *L. pneumophila* に特異的な遺伝子である可能性を示した。
- 2) *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、U937 及び *A. polyphaga* 両宿主内における菌含有ファゴソームとリソソームとの融合調節に関与することを明らかにした。
- 3) *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、野生株と同じく 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が推察された。

<L. pneumophila 新規病原因子の探索研究>

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、その中には、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た。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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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

三宅正紀、福井貴史、伊藤佐生智、辻勉、今井康之：

Legionella pneumophila のマクロファージ感染におけるアクチン結合蛋白質 p57 との相互作用に関する検討

第 123 年会日本薬学会 (長崎)、要旨集-3 p.147、平成 15 年 3 月 29 日

渡邊拓郎、今井康之、三宅正紀：

Legionella pneumophila pmi 変異株 GB112 の性状解析

第 76 回日本細菌学会総会 (熊本)、抄録 p.316、平成 15 年 4 月 2 日

福井貴史、今井康之、三宅正紀：

Legionella pneumophila の熱ショック蛋白質発現と細胞内増殖性との相関について

第 76 回日本細菌学会総会 (熊本)、抄録 p.317、平成 15 年 4 月 2 日

三宅正紀、福井貴史、辻勉、今井康之：

Legionella pneumophila のマクロファージ感染におけるアクチン結合蛋白質 p57 との相互作用について

第 76 回日本細菌学会総会 (熊本)、抄録 p.317、平成 15 年 4 月 2 日

Masaki Miyake, Takashi Fukui, Yasuyuki Imai, Howard A. Shuman：

Legionella pneumophila intracellular growth and protein expression profile within macrophage and protozoa.

American Society for Microbiology 103rd General Meeting (Washington D.C.)

Abstracts p.34, May 19, 2003

Sergey Pampou, Masaki Miyake, Irina Morozova, James Russo, Howard Shuman, Sergey Kalachikov：

Legionella pneumophila microarrays for expression analysis and whole-genome comparisons among related species.

American Society for Microbiology 103rd General Meeting (Washington D.C.)

Abstracts p.204, May 19, 2003

三宅正紀、渡邊拓郎、Maëlle Molmeret、今井康之、Yousef Abu Kwaik：

Legionella pneumophila の細胞内寄生性に関与する新規遺伝子について

第 124 年会日本薬学会 (大阪)、要旨集-3 p.142、平成 16 年 3 月 29 日

三宅正紀、今井康之

Legionella pneumophila アメーバ及びマクロファージ感染性遺伝子 *lipA* の機能解析
第77回日本細菌学会総会 (大阪)、抄録 p.185、平成16年4月2日

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)、抄録 p.186、平成16年4月2日

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)、抄録 p.187、平成16年4月2日

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.

American Society for Microbiology 104rd General Meeting (New Orleans)

Abstracts p.106, May 26, 2004

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) 講演要旨集 p.35、平成16年11月6日

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) 講演要旨集 p.39、平成16年12月4日

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年会日本薬学会 (東京)、要旨集3 p.87、平成17年3月30日

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

菅谷則子、今井康之、三宅正紀

リポドラフトを介した *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

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

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

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

3. 一般講演

三宅正紀：レジオネラ属菌の病原メカニズムについて

第25回星薬科大学大学院研究科助手会・大学院自治会公開合同セミナー (星薬科大学)

平成15年4月26日 講演要旨集 p.1-2

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

分担研究者 江崎孝行

研究要旨 レジオネラ感染症を迅速に診断するための遺伝子検出法、および抗体の検出法を目指した開発を行った。抗原検査に匹敵する迅速検査が期待できる遺伝子検査法を使って *L. pneumophila* の全血清型（1から15型）に対応する検査、および *Legionella* 属の全菌種に対応できるPCR法、およびマイクロアレイ法による検査法を作成した。さらに生菌のみを測定するためにRNAの増幅方法を作成し、DNAとRNAの両方の検査が可能な方法を作成した。一方、患者の抗体の検査も感染症の確定診断には不可欠の項目であるが、血清型に対応できる抗体検査として1型から6型の抗体検査ができる方法の構築を行った。その手として平成17年度にLPSを抗原とした血清型7型から15型および蛍光ビーズアレイを完成させた。

A. 研究目的

レジオネラ感染症の診断には選択培地を使用した分離培養、尿中抗原を検出する抗原検出法、あるいはPCR法などの遺伝子増幅法が試みられている。喀痰の分離培養では培養陽性率が低いので培養法を補完する検査法が必要である。抗原検査は尿中の *L. pneumophila* の血清型1しか検出できないので、他の血清型や *L. pneumophila* 以外の菌種の診断ができないなどの問題点が残されていた。そこで我々はまず、抗原検査に匹敵する迅速検査が期待できる遺伝子検査法を使って *L. pneumophila* の全血清型（1から15型）に対応する検査、および *Legionella* 属の全菌種に対応できるPCR法、およびマイクロアレイ法による検査法の作成を目指した。さらに、レジオネラ感染症が特殊な疾患であるのでルーチン検査で見逃されやすいことから、頻度の高いマイコプラズマ、肺炎球菌などの検査とリンクさせて8種類の病原体を同時に検査する網羅的な検査方法の作成をめざした。抗体の検査では尿中抗原検査がカバーできない1型以外の *L. pneumophila* に対する抗体の検出法、及び *L. pneumophila* 以外の *Legionella* 属の菌種の抗体検査を行なう方法の作成を目指した。

B. 研究方法

1) 遺伝子検査法はまず多型が大きいと予測された *dnaJ* 蛋白の遺伝子配列を *Legionella* 属の全菌種、及び *Legionella* 属の15血清型について配列を決定した。さらに遺伝子の多型を確認するために腸内細菌科の全菌種、*Vibrio*、*Streptococcus*、*Staphylococcus* 属の菌種の配列を決定した。この結果を元に *L. pneumophila* の全血清型に属する菌株を *DnaJ* 遺伝子で検出する方法を作成した。*Legionella* 属の菌種は16S rDNAで検出する方法を作成した。

また、生菌と死菌の識別を行うためRNAの検出ができるNASBA法を使用し、*Legionella* 属菌のRNAの増幅を行なう方法を作成を目指した。さらに8種類の気道感染病原体を同時に検査する網羅的な感染症診断するために8種類を同じ増幅条件で検出する Realtime PCR法の作成を目指した。

2) レジオネラ抗体検査法の作成： レジオネラの血清型を識別している抗原は Lipopolysachar

ide(LPS)であるので、*L. pneumophila* の6種類の血清型のLPS抗原をHot phenol法を改変して精製し、実験に供した。さらに *Legionella* 属菌種が共通に保有する抗原を選択し、*L. pneumophila* 以外の菌種に感染した場合の、抗体の計測を目指して属レベルで抗体のスクリーニングを行なう方法の作成を試みた。レジオネラに共通に存在すると予測される8種類の候補蛋白抗原遺伝子を選択し、その遺伝子産物を無細胞系で発現させ、抗原の大量精製法を確立することをめざした。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。われわれの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、共同研究として抗体計測を実施した。

C. 研究成果

1) 遺伝子検査法の作成：DnaJ配列の多型を決定したところ、16S rDNAより多型が多く、*L. pneumophila* の菌種レベルでの識別が DnaJ遺伝子配列だけで決定できることが確認された。*L. pneumophila* の血清型間の多型は1.5%の範囲の揺らぎがあった。このことから DnaJ配列が1%以内の配列の違いであれば同一菌種の中の株であると予測できることが推測された。この多型は腸内細菌、*Vibrio*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*など他の系統の菌群でも同じことが立証され、1つの菌種の株の配列の揺らぎがほぼ1%に収まっていた。このデータを利用し DnaJ遺伝子を使用し *L. pneumophila* の全血清型を検出する primer の選択ができた。16S rDNA 配列は独立した菌種間の配列が類似しているため菌種を検出する方法として不適であったが、*Legionella* 属全体を検出する primer としては有用であった。属を検出するプライマーで増幅した領域には菌種に特異的な配列を含んでいるため、この配列をシリコンチップに固定し、増幅産物の同定を行なう方法を確立した。アレイには *Legionella* 属の40菌種のプローブを固定し、属レベルでの遺伝子増幅と、シリコンアレイで種を決める方法を確立した。

環境から *Legionella* 属の菌種を検出する場合、消毒薬、及び加熱処理で死滅した菌種の核酸を検出している可能性があることが指摘されてきた。細菌のRNAの寿命は極めて短く、菌が死滅すると速やかに消滅するため、RNAのみを増幅するNASBA法を用いて *L. pneumophila* の検出系を作成した。その結果、1個/100ml まで検出できる高感度名RNA増幅系を作成することができた。気道感染の主要な細菌性病原体を同時に検査する Realtime PCR法は 肺炎球菌、インフルエンザ桿菌、マイコプラズマ、クラミジア、オリエンチア、コクシエラ、結核菌、及びレジオネラを同時に検出した。

2) レジオネラに対する抗体検査法の作成：

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。

一方、レジオネラ属全体の菌種に共通な抗体を計測する目的で、8種類の抗原蛋白を選択し、無細胞系で抗原を大量精製する方法を試みたが、蛋白抗原の収量が少なく、実用的な濃度の蛋白を得られなかった。また *L. pneumophila* 以外の菌種の患者血清の入手方法がなく、得られた抗原を使った抗体計測の確認ができなかった。

D. 考察

レジオネラは土壌や低栄養状態で生息する環境菌であるが、喀痰などNa濃度が高い環境からの分離培養は困難なことが多く、確定診断が難しい。尿中抗原の検出キットが開発され簡便に検査ができるようになったが、十分な感度がなく、レジオネラ属全体に共通の検出方法も確立されていなかった。遺伝子検査で *L. pneumophila* 及びその他の菌種の検出方法が確立できたので、迅速診断体制は構築できた。特にRNA検出の感度は高く、生菌を計測することから今後重要な方法になると推測している。しかし抗体の計測は *L. pneumophila* の血清型1-6型にとどまり、属全体の菌種の抗体の計測方法は完成できなかった。

したがってこれらの抗体価の計測には各菌種のレジオネラの菌体を使った抗体計測を実施しなければ抗体計測はできないという課題が残された。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版 年	ペー ジ
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	工藤俊章, 大熊盛也	難培養微生物研究の最新技術	シーエム シー出版	東京	2004	94- 100
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	分担

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
江崎孝行 他	呼吸器感染症の網羅的診断に向けて	分子呼吸病	8巻4号	61-64	2004
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
Liu H, et. al.	Use of the <i>dnaJ</i> gene for the detection and identification of all <i>Legionella pneumophila</i> serogroups and description of the primers used to detect 16S rDNA gene sequences of major members of the genus <i>Legionella</i> .	Microbiol. Immunol	47	859-869	2003
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	泌尿器外科	18巻	798-804	2005
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巻	610-622	2004
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

レジオネラ肺炎診療の現状に関する研究 総合研究報告書

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，竹田知史，岡元昌樹，小松 方，島川宏一

研究要旨

レジオネラ肺炎診療の現状について平成 15 年から平成 17 年までに我々が行った研究についてまとめた。診断方法についての尿中抗原検査の有用性ならびに、最近の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報告し、また市中肺炎におけるレジオネラ肺炎の頻度の検証と今後の課題についてまとめた。疾病の認知度と診断方法の普及及び集団発生に伴う社会問題化などの背景から、今後さらにレジオネラ肺炎の実態を追跡し研究を継続する必要性があると考えられた。

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検討する。特に尿中抗原検査を用いた実地臨床での評価検討を行う。

B. 研究方法

本邦におけるレジオネラ肺炎の現状を調査検討するために以下の検討を行った。

- 1) 平成 15 年 天理よろづ相談所病院及び近隣の市中病院においてレジオネラ尿中抗原検査を施行した連続 100 例の臨床的検討
- 2) 平成 16 年 京都大学医学部呼吸器内科及びその関連施設におけるレジオネラ肺炎 29 例の臨床的検討
- 3) 平成 17 年 天理よろづ相談所病院における市中肺炎中のレジオネラ肺炎の頻度の検証（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て行い、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わる倫理指針に基づき、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。

C. 研究結果

- 1) 平成 15 年 検討した 100 例のうち、レジオネラ肺炎は合計 11 例で全て市中肺炎散発例であった。そのうち 10 例を尿中抗原検査陽性でもって迅速診断が出来た症例であった。11 例全例男性で基礎疾患が重症であった 1 例が死亡、他 10 例は治療により改善した。
- 2) 平成 16 年 過去 5 年間で検討可能であったレジオネラ肺炎は 29 例で市中肺炎散発例 27 例、工場生産系で発生した集団発症が 2 例であった。29 例中 24 例に対し尿中抗原検査が施行され、診断感度は 21 例 / 24 例 (87.5%) であった。また治療薬についてはキノロン系薬が 20 例に対して用いられ効果及び認容性に問題は見られなかった。29 例中 4 例が死亡されていたが、全例基礎疾患が重症であった。
- 3) 平成 17 年 当院での市中肺炎の原因微生物の頻度の検証を前向きに連続 92 例について検討した。その中ではレジオネラ肺炎は 1 例のみであった。意識障害を伴う重症肺炎であったが尿中抗原検査で迅速診断し、改善した。この検討は現在も進行中である。

D. 考察

レジオネラ肺炎は、集団発生の社会問題化及び日本呼吸器学会市中肺炎ガイドラインが出されたことで最近でこそ認知度が高まりつつあるが、我が国においては 1986 年の培養陽性例の報告¹⁾からまだ 20 年とその疾患の歴史は浅い。1991 年に旧厚生省班のレジオネラ肺炎の診断・検査及び治療指針²⁾、1999 年感染症新法の制定によりようやく報告数は増加してきたが、その病態解明については細菌学的側面、疫学的側面、臨床医学的側面全てにおいて全く十分とは言えず、逆にその本態についてそれぞれ未知の領域が多く存在しており、それら日々の研究により今後の

病態解明及びひいては社会への貢献が可能となる。

今回我々が行ってきた3年間の検討では、主に臨床市中病院におけるレジオネラ肺炎の位置づけを検証し、今後の実地臨床及び社会への還元を目標としてきた。その中で中心になるのは何と言っても迅速診断方法としての尿中抗原検査の普及（現在健康保険適応）が挙げられる。平成15年のレジオネラ肺炎疑い例での尿中抗原検査の有用性の検討、及び平成16年のレジオネラ肺炎診断症例29例における迅速診断能及び診断感度の高さがそれを裏付ける結果となった。ただし、この尿中抗原検査は現在までのところでは、*L. pneumophila* に対してのみ診断能力があるといわれており、より幅広い菌種をカバーする迅速診断方法の開発と普及が待たれるのも事実である。

また平成15年から行ってきた3年間の検討を通じて、臨床市中病院においてのレジオネラ肺炎はやはり重症肺炎を呈することが非常に多いということが明らかになった。これをふまえて治療指針についても検討したが、2005年日本呼吸器学会市中肺炎ガイドライン³⁾においては、重症肺炎に対してはレジオネラ肺炎を想定した抗菌薬選択を明示していることから今後も日常臨床に問題の無いものと考えられた。

今後のレジオネラ肺炎の研究において、主に臨床医学的側面から課題を以下に挙げて考察をまとめたい。

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。前述した尿中抗原検査の更なる進歩に加えて、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⁴⁾や、DNAチップ⁵⁾が開発され、それがレジオネラ肺炎の迅速診断にも有用であることが示されてきている。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。これらの点を解決しつつ、より実地臨床において有益性の高い診断技術の普及が望まれる。

2) 軽症中等症肺炎の検討

市中肺炎散发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⁶⁾。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我々の施設の前向き検討では、やはり重症肺炎症例が多いことから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

平成15年から3年間、レジオネラ肺炎の臨床の現状に関する研究を行ってきた。診断技術や治療方法は日々進歩してきているが、本邦における歴史は20年と浅くいまだ未知の部分が非常に多いことから、今後も研究が必要と考えられた。

文献

- 1) 齋藤 厚, 下田照文, 長沢正夫 他: 本邦ではじめての Legionnaires' disease の症例と検出菌の細菌学的性状. 感染症誌 1981; 55: 124-128
- 2) 厚生省レジオネラ症研究班: 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年4月
- 3) 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編 2005年10月
- 4) Mackay IM: Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiol Infect 10: 190-212, 2004
- 5) 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
- 6) 化学療法の領域: 20: 56-69, 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

- 1) 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 奈良
- 2) 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, 後藤俊介,
竹田知史, 岡元昌樹, 野間恵之, 弓場吉哲, 小橋陽一郎, 田口善夫
入院市中肺炎における死亡例の臨床的検討 第 45 回日本呼吸器学会学術講演会
2005.4.14 千葉
- 3) 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 穰, 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
- 4) 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

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—

分担研究者

佐賀大学医学部臨床検査医学講座 青木洋介

A：研究目的

レジオネラ属菌への集団曝露事例においては、大多数の未感染個人の中から真のレジオネラ感染症あるいはその疑い例をいかに適確に拾い上げるかが、健康被害への対応という観点から重要である。平成14年7月に宮崎県H市の循環式温泉施設においてレジオネラ集団感染が発生したが、この事例における来客者総数は19,773名におよび、施設利用客1,300名を対象に施設管理不備の責任を追及する補償交渉が行われた^{1, 22a)}。このような大規模の集団曝露が発生した際に、問診、聴診、血液検査、胸部X線撮影、喀痰培養検査など種々の呼吸器専門的診療体制を全対象（曝露）者に等しく供給することは人的・医療財源的観点から容易ではない。集団感染症における診断は、レジオネラ感染症孤発例に対する診断基準とは異なり、過去の曝露集団から得られた臨床疫学的データに基づく疫学的診断法を応用することが実践的対応として望ましい。本研究班における当分担研究は、1) フローチャート形式の1) 問診と、2) 尿中抗原検査、のそれぞれの結果の組み合わせにより、要精密医療群と経過観察可能群とを数値的に群別することを目的としたものである。

B：研究方法

宮崎県H市におけるレジオネラ集団感染事例の調査報告¹⁾に基づき、臨床疫学的診断に必要な因子のレジオネラ感染症診断寄与度について解析を行った。ある臨床項目（例えば基礎疾患、飲酒歴など）が有り（陽性）あるいは無し（陰性）のいずれの場合においても診断確率の増減に定量的影響を与える。これは各因子の陽性尤度（positive likelihood）および陰性尤度（negative likelihood）と呼ばれ、ある因子の感度および特異度から容易に算出することができる。陽性尤度とは、ある診断基準項目が陽性の場合にどの程度の診断確率の増し幅があるか、陰性尤度とは、ある診断基準項目が陰性の場合にどの程度の診断確率の減弱があるか、を表す数値である。前者は真陽性者（感度）／擬陰性者（1－特異度）の比、後者は擬陽性者（1－感度）／新陰性者（特異度）の比、で表示される。本研究のレジオネラ診断確率の計算には、各臨床因子の陽性あるいは陰性別にそれらの尤度を掛け合わせた結合尤度（combined odds）を求め、この値を確率に換算した（確率 $p = \text{odds} / [1 + \text{odds}]$ ；オッズが1の場合、確率は50%であるためこの式が成り立つ）。

C：研究結果

① 各臨床因子の尤度

本分担研究において検討したレジオネラ集団曝露事例における診断確率算出に用いた臨床情報は、曝露を受けた個人の1)発熱、2)喫煙歴、3)基礎疾患(男性のみ)、4)飲酒歴(女性：>5日/1ヶ月)の4項目であり、これらはいずれもレジオネラ症(疑い例を含む)と未感染者と考えられる群間に有意が認められた因子である¹⁾。表1に、これらの因子のレジオネラ感染症診断に対する陽性尤度および陰性尤度を示す。また、Binax社のレジオネラ尿中抗原キット(Binax NOW)の感度・特異度^{3, 4)}、および陽性尤度比ならびに陰性尤度比を合わせて示す。

② 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の算出

曝露を受けた個人の多様な臨床背景をもとに、レジオネラ曝露個人の健康被害の客観的評価(この場合はレジオネラ感染症の診断確率)を行なうためのフローチャートを男女別に作成した。図1は男性曝露者を対象とした確率算出のフローチャートである。まず、発熱、喫煙歴、基礎疾患の有無を問診により聴取し、これらの8通りの結果についての結合尤度から確率を算出した。尿中抗原検査前のレジオネラ診断確率(検査前確率)が50%を超える組み合わせは3通りあり、これらの各々についてレジオネラ尿中抗原検査を施行した場合の検査後確率を最下段に示す。8通りの臨床因子の組み合わせからレジオネラ感染症の診断確率が50%を越える場合は4通りとなり(図1左より98%, 64%, 95%, 96%)、これらの事例を対象に個人レベルにおいて血液検査、胸部線検査、喀痰培養などの医療行為(検査)を行なうことは妥当であると推測される。同様に図2は女性曝露者を対象とした確率算出のフローチャートである。男性の場合と異なり、発熱、喫煙歴、飲酒歴の有無を問診により聴取した場合を想定し、同様に検査前確率が50%を越える組み合わせは6通りであり、これらの各々についてレジオネラ尿中抗原検査を施行した場合の検査後確率を最下段に示す。8通りの臨床因子の組み合わせからレジオネラ感染症の診断確率が50%を越える場合は10通りとなる(図2左より99%, 87%, 97%, 52%, 98%, 69%, 91%, 97%, 52%, 91%)。以上が、患者問診後の検査前確率と、それに尿中抗原検査を組み合わせた検査後確率を得るまでのフローチャートである。

D：考 察

本研究は、今後の多数のレジオネラ集団曝露事例発生を想定し、その事態に応用できる効率的な曝露者トリアージ法を考案したものである。ここで述べるトリアージとは、どの個人が自宅経過観察でよいのか、どの個人が医療行為(精密検査)を必要とすると判断されるかを客観的に判別する方法である。

10,000名以上に及ぶ曝露者、1000名を越える健康被害疑義の届出者が発生した場合に、本感染症孤発例の重症市中肺炎患者のマネジメントと同レベルの医療行為(問診・診察・検

査)を、1)全ての対象(暴露)者について、2)医師が行う、ことは多大な労力と医療費を伴うことになる。発熱や呼吸器症状の有無を問診したとしても、その結果によりレジオネラ肺炎の可能性がありそうな個人を、多数の臨床医の目で客観的に、再現性を保持しながら見極めることは容易ではない。

つまり、孤発例と同様の診療形態を集団感染事例に適用することは possible であるが、feasible/practical ではない。換言すれば、集団感染症においては異なる診断法・診断基準を備えておくべきであり、ここに臨床疫学的手法を用いた患者トリアージ法の有用性、必要性が生じる。

本研究で作成したフローチャートを用いれば、「問診+尿検査」のみであるため、何時でも、何処でも、誰でもが、安全に、患者の苦痛を伴うことなく、客観的・定量的数値表示によるレジオネラ診断確率を短時間のうちに算定することができる。

男性用のフローチャートの結果からは、検査前確率 50%以上に尿中抗原検査を施行し、その結果としての検査後確率が 50%を越える個人について“要医療判定“を下すことを推奨することはスクリーニング的手法として妥当であると思われる。

一方、女性の場合は、図2から明らかなように検査前確率が 80%を越える場合は、それに引き続く尿中抗原検査の結果如何によらず検査後確率は 50%を越えるため、これらの群は尿中抗原検査を施行せずに“要医療“と判定してよいとも推測される。

本研究のフローチャートは、宮崎県H市における過去の集団曝露事例の解析結果に基づくものである。このトリアージ方が今後の集団曝露事例に妥当性を以って応用できるかについては検証がなされなければならない。さらに、今回の研究は尿中抗原検査として Binax NOW の使用を想定したものであるが、本キットは *Legionella pneumophila* Serogroup1 のみの抗原を検出対象としているため、集団感染事例における本菌の血清型がこれ以外の場合にはフローチャートの検査前診断確率を参照することになる。再度、不幸にしてレジオネラ集団感染事例が発生した場合には、曝露個人に対して従来同様の対応を行う一方、本トリアージ法を迅速に適用し、要医療者判別法として真に有用であるかについて検討が行なわれる必要がある。

E：結論

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る。この場合、臨床医の経験年数や専門分野を問わず、かつ臨床医以外の医療スタッフが対応できるような客観的診断法が望ましい。臨床疫学的診断は各医師の臨床経験に基づく診断・治療に関する裁量権を冒すものではない。トリアージ案に合致しない場合でも、医師が必要と認める医療行為は最優先して患者に提供されるべきである。しかしながら、個の集合体から得られたデータに疫学的解析を加えたツールを目前の患者の診療方針に応用することの有用性について今後多様な医療分野で検討されることが望まれる。

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において発表予定

H. 知的財産権の出願・登録

該当事項なし

参考文献

1. 加藤貴彦，他．レジオネラ発症に関する個体・環境要因のリスク解析．平成14年度厚生労働省科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）「室内空气中の微生物防止対策に関する研究」－レジオネラ症集団感染事例の疫学調査部会報告書 財団法人ビル管理教育センター 55－69, 2002.
2. 松元信弘，他：循環式温泉を感染源としたレジオネラ肺炎の集団発生について．日呼吸会誌 42: 75－79, 2004.
- 2 a. 松元信弘：循環式入浴施設を感染源としたレジオネラ肺炎の画像所見ならびに臨床像の検討．Bayer RTI Symposium, 2004.
3. Yzerman EP, et al. Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' disease in The Netherlands. J Clin Microbiol 40: 32326－3236, 2002.
4. 新垣紀子，他：レジオネラ肺炎に対する早期診断法としての尿中抗原検出の意義．感染症誌 73: 421－428, 1999.

表 1 : 各種臨床的 parameter のレジオネラ感染症 a) の診断特性 (平成 16 年度報告書より一部再掲載)

	感 度	特異度	LR (+) ^{b)}	LR (-) ^{c)}
発熱 (38°C以上)	86 %	50 % ^{d)}	1.72	0.28
喫煙歴あり				
男性	79 %	37 %	1.25	0.56
女性	19 %	93 %	2.71	0.87
基礎疾患あり (男性)	16 %	94 %	2.66	0.89
飲酒歴あり (女性)	29 %	94 %	4.83	0.75
尿中抗原テスト (Binax U-Ag)	70 %	93 %	10.0	0.32

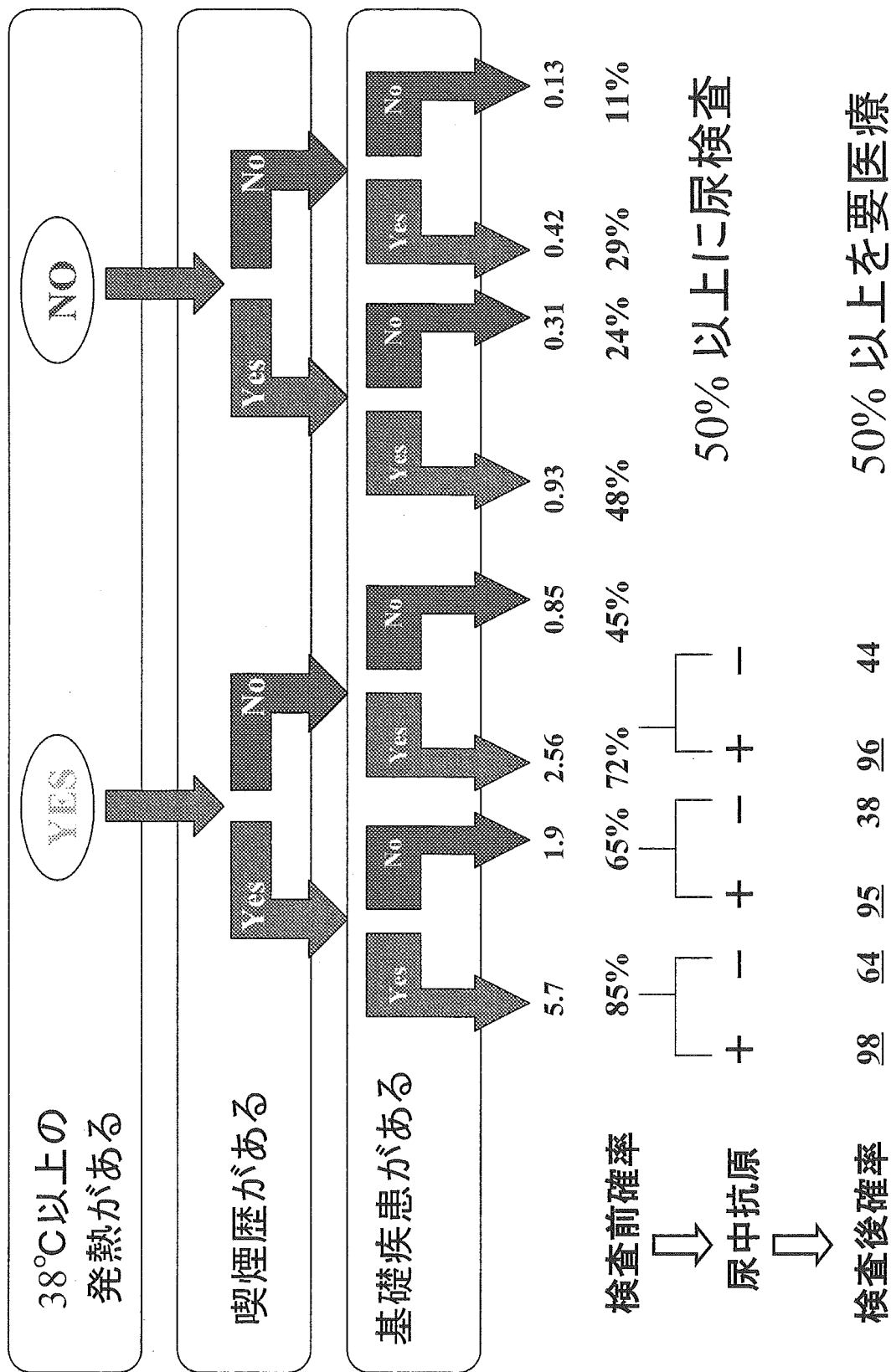
a) 疑い例を含む (入浴より 2 週間以内に症状が出現し, 胸部 X 線写真でレジオネラ肺炎に
矛盾しない肺炎像を認める)

b) LR (+) = Positive likelihood ratio : 感度 / 1 - 特異度

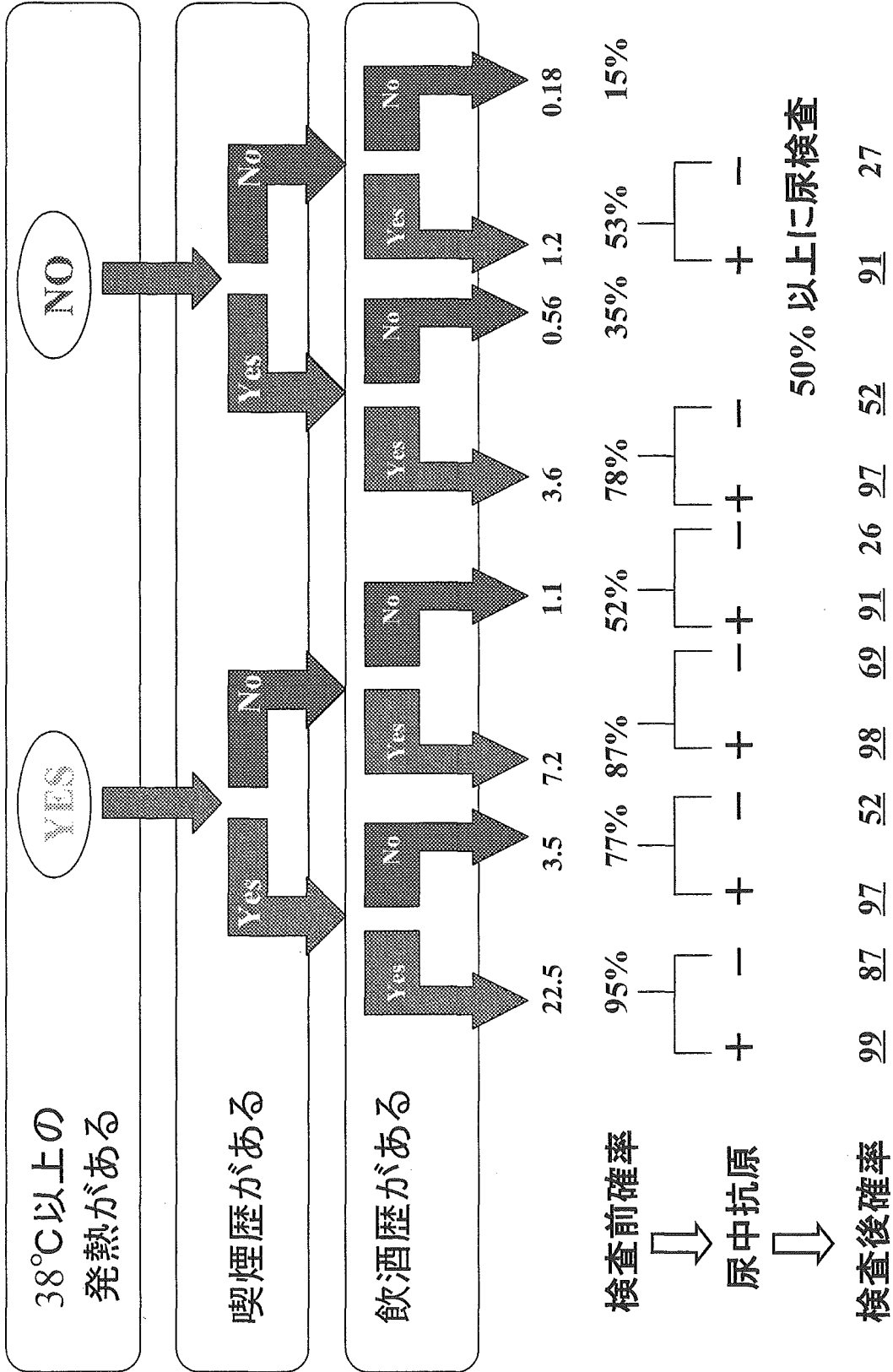
c) LR (-) = Negative likelihood ratio : 1 - 感度 / 特異度

d) 発熱の特異度は便宜的に 50 % に設定した (本文, 研究方法を参照)

問診と尿検査による診療指針（男性） - レジオネラ研究班（案） -



問診と尿検査による診療指針（女性） — レジオネラ研究班(案) —



50% 以上を要医療, あるいは尿検査なしで要医療

III. 研究成果の刊行に関する一覧表