

SBT 法でも、由来により遺伝子型の分布や頻度が異なることが観察されており、同様の結果となった。レジオネラ症患者が自然環境に由来する *L. pneumophila* に感染したことは自明であり、したがって、環境に存在する一部の菌株に感染したと考えられる。わが国においてレジオネラ症の主要な感染源は温泉などの入浴施設であると推測されている。臨床分離株と浴槽水分離株で共通の VNTR 型が見られると予想されたが、臨床分離株は 32 種類、浴槽水分離株は 23 種類と多様な VNTR 型が検出されたなかで、共通だったのは 1 種類だけだった。Minimum spanning tree を見ると、浴槽水が感染源と考えられる患者分離株の VNTR 型は浴槽水分離株と類縁度が高い傾向がある (図 1) ので、検査の株数を増やせば、共通の型が見出されると考えられる。また、土壌分離株の VNTR 型 16 種類のうち 2 種類が臨床分離株の VNTR 型と共通で、感染源不明の患者分離株で土壌分離株と類縁度が高い株が幾つか見られることから (図 1)、レジオネラ症患者の感染源を考える際に、土埃なども念頭に入れる必要がある。

今回 VNTR 型が得られた菌株について、SBT 法³⁾⁴⁾の結果⁵⁾についても同様に D 値を計算したところ (表 2)、冷却塔水分離株についてはどちらの D 値も不十分だったものの MLVA 法の D 値が高く、それ以外はどちらも型別法としては十分な値で、ほぼ同等の D 値だった。冷却塔水分離株 28 株は SBT 法では 4 種類に分かれたが、MLVA 法ではそれがさらに細分化され、7

種類に (SBT 法における ST1 が MLVA 法で 3 種類に、ST154 が MLVA 法で 2 種類に) 分けられた (図 1) ため、D 値が高くなった。同様に土壌分離株でも、ST22、ST48 がそれぞれ 4 種類の VNTR 型に分かれたが、逆に、浴槽水分離株でもっとも多く見られた (8・8・10・2・5・4・1・13) は、5 つの ST に分かれた (ST59、ST86、ST128、ST603、ST605、図 1)

株によっては一部の領域で PCR 産物が得られず、型別できなかつた。8 株が増幅できなかつた Lpms17 について新たに内側にプライマーを設定したところ、1 株を除いて PCR 産物が得られたのでプライマー部位に変異が生じているために増幅できなかつたと思われる。

E. 結論

わが国のレジオネラ症患者からの *L. pneumophila* 臨床分離株 40 株と、環境由来の *L. pneumophila* 血清群 1 株 (土壌分離株 26 株、冷却塔水分離株 28 株、浴槽水分離株 34 株) 計 128 株について MLVA 法を用いて型別ができた。73 種類に分類され、その疫学的有用性が確認できた。従来行われている SBT 法と比較すると、一部の領域について PCR 産物が得られなかつた株が 15 株あつたが、128 株が型別でき、分解能は同等かそれ以上で、手法として SBT 法に比べ簡便であつた。また、SBT で同一遺伝子型を示したものを細分化できる場合があり、SBT 法が世界的に行われている現時点では、併用することが望ましい。現在、感染源の特定のため

の最適法と考えられているパルスフィールドゲル電気泳動法と比較しても簡便であり、感染源の特定のための菌株の迅速なスクリーニングに最も適していると考えられる。

謝辞

今回解析した菌株を分与くださった安形則雄、磯部順子、市瀬正之、岩渕香織、小笠原準、奥野ルミ、小山敏枝、金子紀子、烏谷竜哉、河野喜美子、黒澤 肇、小堀すみえ、小山敏枝、鈴木敦子、中嶋洋、古畑勝則、沼田 昇、山本一成、渡辺祐子（敬称略）の諸氏に感謝いたします。

F. 参考文献

- 1) Pourcel C, Visca P, Afshar B, D'Arezzo S, Vergnaud G, Fry NK. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Legionella pneumophila* and development of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. 2007. *J. Clin. Microbiol.* 45:1190-9.
- 2) Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin.*

Microbiol. 26:2465-6.

- 3) Gaia, V, Fry, NK, Afshar, B, Lück, PC, Meugnier, H, Etienne, J, Peduzzi, R, and Harrison, TG. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 43:2047-52.
- 4) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. 2007. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 45:1965-8.
- 5) 厚生労働省科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成 19～平成 21 年度総合研究報告書. 研究代表者：倉 文明

G. 研究発表

H. 知的所有権の取得状況

別項（*Legionella pneumophila* の SBT 法による遺伝子型別）に記載。

平成22年度分担研究報告書

抗酸菌の調査（*Mycobacterium avium* の遺伝子型）

研究分担者 山崎 利雄 国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室
前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部

研究概要

研究室保存の *Mycobacterium avium* を用いて縦列反復数可変 (Variable Numbers of Tandem Repeats ; VNTR) 領域型別解析法をおこなった。VNTR 法は、*M. avium* 分布状況調査で、菌株鑑別能力と簡便性において大変有用であり、今後の抗酸菌調査に役立つ方法であることがわかった。

A. 研究目的

結核菌以外の抗酸菌（非結核性抗酸菌）は、自然界に広く分布している。我々が、循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化を検討するために、おこなった以前の調査でも、レジオネラ属菌とともに、非結核性抗酸菌が分離された。非結核性抗酸菌は、健常人にとっては、ほとんどが日和見感染菌である。従って、患者さんの臨床検体から非結核性抗酸菌が分離されたからといって即非結核性抗酸菌症と診断される訳ではないが、非結核性抗酸菌の中には、何らかの原因で免疫力が低下している人に感染して発病させる菌が存在する。特に、非結核性抗酸菌症の原因菌のうち7割を占める *Mycobacterium avium* が当時の調査では最も多く分離されたので、その対策が必要である。また、以前、家庭用の24時間風呂から *M. avium* が検出されたという報告はあるが、病気との関連は明確に証明されていない。そこで以前の調査から5

年以上経過し、調査地域も関東地方南部に限られていたため、調査地域を拡大して公衆浴場等から分離される抗酸菌の菌種が増えるかどうかの再調査をするとともに、ヒト、動物、公衆浴場の浴用水等から分離された *M. avium* の縦列反復数可変 (Variable Numbers of Tandem Repeats ; VNTR) 領域のパターンを比較する方法 (VNTR 法と略す) を用いて、環境中の *M. avium* の分布状況を調べ、*M. avium* 症を引き起こしやすい VNTR パターンと、環境中に存在する *M. avium* との関連性について検討し、公衆浴場等における *M. avium* の対策に役立てることを最終目的とした。今年度は、当研究所保存の *M. avium* を用いて VNTR 法による菌株の鑑別が、どの程度まで可能なのかについて検討した。

B. 研究材料と研究方法

1. 浴槽水由来抗酸菌の分離と増菌培養
平成16年度ー平成18年度間にホテル、

旅館、又は公衆浴場等より採取された浴槽水 100ml の遠心分離後の沈渣を、1ml の滅菌精製水に再懸濁した。この懸濁液に 1ml の 4% NaOH を加えて、室温で 20 分間処理後、このアルカリ処理液 0.1ml ずつを 2~3 本の 2% 小川培地に接種し 36 ±1°C で培養し、コロニーの出現状況を毎週観察した。コロニー陰性の場合には 8 週間まで培養した。検出された菌を、チール・ネルゼン染色法で抗酸菌であることを確認後、滅菌精製水で微濁浮遊液を 10 倍希釈系列で希釈し、それぞれの 0.1ml ずつを Middlebrook 7H10 寒天培地に接種し、5% CO₂ インキュベーター内で 36 ±1°C で 2~3 週間培養後、単コロニーを釣菌し、増菌したものを -80°C に凍結保存した。これを再溶解し、1% 小川培地または Middlebrook 7H9 液体培地にて増菌した。

2. 同定試験

生化学的検査法による同定試験は、極東抗酸菌鑑別セット（極東製薬工業）を用いた。試験操作法、観察判定日、観察判定法は、使用説明書にしたがった。抗酸菌鑑別セット使用による同定試験は、発育速度、集落性状、着色、光発色性試験、p-ニトロ安息香酸（PNB）500 μg/ml 含有培地上の発育、エタンブトール（EB）5 μg/ml 含有培地上の発育、ピクリン酸（PA）0.2% 含有培地上の発育、p-アミノサリチル酸（PAS）2mg/ml 含有培地の黒変、塩酸ヒドロキシルアミン（HA）500 μg/ml 含有培地上の発育、硝酸塩還元試験、Tween80 水解試験である。さらに、アシルスルファターゼ試験を追加した。これらの生化学的検査法その他、主な抗酸菌 18 菌種の同定が可能な DNA-DNA ハイブリダイゼーション（DDH）試験（極東製薬工業）を用いた。DDH 試験法の操作は、使用説明書に従った。また、

16S-rRNA の DNA のシーケンスも行った。

3. DNA の抽出

1% 小川培地あるいは Middlebrook 7H9 液体培地で増菌させ、菌塊をインスタジャンマトリックス 200 μl に入れ、ヒーティングブロックを用いて 56°C 15~30 分処理後、10 秒間のボルテックスによる攪拌を行い、100°C で 8 分間加熱殺菌をするとともに DNA の抽出を行った。10 秒間のボルテックスによる攪拌、12,000 回転で 3 分間高速遠心してその上清をテンプレート DNA とした。

4. 分離菌の 16S-rRNA の DNA シーケンス

生化学的検査法や DDH 試験法において同定不能と判定された菌株および同定結果を再確認するために、分離菌から DNA を抽出し、16S-rRNA を標的としたプライマー 16Ss (5' GAGAGTTTGATCCTGGCT CAG3') と 16Sas (5' TGCACACAGGCCACA AGGGA 3') を用いて PCR を行い、PCR プロダクトを High pure PCR product Purification kit（ベーリンガーマンハイム社）を用いて精製後、Dye terminator cycle sequencing 法にて DNA を標識し、スピнкаラム法により未反応の蛍光色素を取り除いた後、ABI310 シーケンサーにてシーケンスをおこなった。得られた結果を Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDM) あるいは、NCBI の nucleotide-nucleotide BLAST のデータベースと比較して、菌種の決定を行った。

5. VNTR 法

PCR は、西森らの方法にしたがって表 1 に示した 17 種類のプライマーセット

(MATR) を当初用いたが、実験結果より 15 種類のプライマーセットを用いることにした。PCR は、95°C 5 分のプレヒーティング後、98°C 10 秒、68°C 30 秒、72°C 1 分

の増幅サイクルを36回実行した。PCR産物を1×Tris-borate (TBE)、2.5%アガロースゲルにてサイズマーカー（100bp DNA Ladder Marker）と共に電気泳動した（図1）。泳動後、サイズマーカーより増幅産物のバンドのサイズを簡易的に計測して、西森等の換算表（表2）にしたがって反復配列のコピー数（TR数と略す）を求め、アリルプロファイルを作成し、Bio Numerics ver.5.1ソフトを用いてMinimum spanning tree法により解析した。

6. 供試菌

今年度は、当研究室にて冷凍保存された*M. avium* 50株を用いた。その分離された由来菌株の内訳は、ヒト22株、鳥11株、象1株、関東地方にある温泉地のホテル、旅館、公衆浴場および社会福祉施設等の浴槽水12株や濾材4株である。

C. 研究結果

1. *M. avium* 症患者と患者宅循環式風呂濾材由来菌株の比較

M. avium 症患者さんと、この患者さん宅の24時間循環式風呂濾材から分離された3株の*M. avium*について、PCR後の電気泳動結果を図1に示した。電気泳動後に各バンドの大きさを計測し、表2の換算表よりアリルプロファイルを作成した結果を表3に示した。濾材由来の3菌株と患者由来株のアリルプロファイルは、良く一致していた。MATR-0領域とMATR-10領域の増幅用プライマーセットでは、増幅バンドが見られなかったため、以後の実験では、MATR-0とMATR-10のプライマーセットは用いなかった。

2. 由来が異なる*M. avium* 株のVNTR法による検討

当研究室にて冷凍保存された由来が異なる*M. avium* 50株を用いてVNTR法をお

こなったアリルプロファイルを表4に示した。象1株と鳥由来3株は、全く同じパターンを示した。ヒトおよび浴槽水由来の*M. avium*のアリルパターンは複雑であった。

3. Minimum spanning tree法による解析

表4のアリルプロファイルをBio Numerics ver.5.1ソフトを用いてMinimum spanning tree法により解析した結果を図2に示した。Minimum spanning tree法による解析では、3つのグループに大別された。

D. 考察

M. avium 症患者と患者宅循環式風呂濾材由来菌3株の比較を表3に示した。TR数が、非常に近いパターンを取っていたことにより、同一菌であると思われる。状況からして、*M. avium* 症患者が入浴中に排菌したものが、浴槽に入り、調査日の浴槽水からは検出されなかったが、風呂が24時間循環式のため濾材に吸着し、濾材で増殖したものが検出されたと考えられる。

MATR-0（レーン1）とMATR-10（レーン11）の2つの領域を増幅するというプライマーセットでは、図1に示すように増幅バンドが見られなかった。このことは、森山らも報告している。西森らにより報告された*M. avium*のVNTR法用プライマーは、*M. paratuberculosis*のシーケンスを基に報告されたもので、MATR-0は、*M. paratuberculosis*しか増幅せず、MATR-10は、PCR増幅回数が36サイクルでは検出されないため、高感度の耐熱性ポリメラーゼを用いて42サイクルで増幅したという鹿住らの報告もある。したがって、われわれの実験では、MATR-0とMATR-10のプライマーセットは、用いないことにした。

Bio Numerics ver.5.1 ソフトを用いた Minimum spanning tree 法は、似ている遺伝子型 (ST) 同士を各遺伝子の差異数に比例した長さの枝で結び、枝の長さの総長が最小になるように図 2 の様に配置したもので、円の内部の数字は、株名を示し、円の大きさは、株数に比例している。*M. avium* は、鳥が病気になり環境汚染が広がったと考えられてきたが、鳥由来の *M. avium* がヒトや浴槽水由来の *M. avium* と離れた位置にあることは興味深い。更に菌株数を増やし、ヒト、動物、公衆浴場の浴用水等から分離された *M. avium* について関連性があるかどうかを検討して行く必要がある。

E. 結論

VNTR 法は、*M. avium* 分布状況調査で、菌株鑑別能力と簡便性において大変有用であり。Minimum spanning tree 法による解析では、*M. avium* が 3 つのグループに大別される事が分かった。

F. 参考文献

- 1) 齊藤肇、村上 和保、石井則久、權赫欄、「24 時間風呂」からの *Mycobacterium avium* complex の検出、結核 75 : 19-25、2000
- 2) 西森 敬、内田郁夫、田中 聖、西森知子、今井邦俊、柏崎佳人、村田典久、神間清恵、VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル、Molecular 動衛研研究報告 第 109 号、25-32、2003.
- 3) 森山誠、小川賢二、西森敬、打矢恵一、伊藤哲也、八木哲也、中島一光、中川拓、垂水修、二改俊章、臨床由来

Mycobacterium avium における Variable Numbers of Tandem Repeats 型別解析法の有用性の検討、結核 81 : 559-566、2006

- 4) 鹿住祐子、宇田川忠、前田伸治、村瀬良郎、菅原勇、奥村昌夫、東 由桂、後藤美枝子、常松範子、*Mycobacterium avium* タイピングにおける Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 法と Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法の有用性の比較、結核 82 : 741-748、2007

- 5) 山崎利雄、杉山寛治、大畑克彦：浴槽水からの抗酸菌の検出状況と検出株の同定。厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）「循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究」主任研究者遠藤卓郎、平成 16 年度～平成 18 年度総合・分担研究報告書 p 67-73

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

- 1) 山崎利雄、倉 文明、循環式浴槽における浴用水の抗酸菌の検出調査、第 80 回実験結核研究会総会、2010 年 5 月、京都
- 2) 前川純子、菊川紀世己、常 彬、村井美代、山崎利雄、レジオネラ属菌の菌種同定と遺伝子型別、第 22 回日本臨床微生物学会総会、2011 年 1 月、岡山

H. 知的所有権の取得状況

なし

表1 *Mycobacterium avium* のVNTR 型別用プライマー

VNTR領域名	プライマー名	シーケンス	塩基数
MATR-0	MSPCR-310	5':TCGGCCAGCTTGATCTTCTC	20
	MSPCR-839	5':TCCGTAACCGTCATTGTCCA	20
MATR-1	TR165-1	5':GAACGTTGGGCCGAATGCGA	20
	TR165-2	5':GTGTCGGACCCCTCCCGTAA	20
MATR-2	TR176-1	5':TTGAGCAGCTCGTAAAGCGT	20
	TR176-2	5':CGCGCTCAAGGAGATGGTTC	20
MATR-3	TR232-1	5':CCAATCACAACGGCACCATC	20
	TR232-2	5':TCCTCGACAATCAGCACACT	20
MATR-4	TR65-1	5':GACAATGGCATGCCGATCCT	20
	TR65-2	5':CGCTACGGCCTTCTCCATCT	20
MATR-5	TR130-1	5':CTTGCAGCAGGACGATCAGG	20
	TR130-2	5':GTGGTCGAAGTCGCTGTGG	20
MATR-6	TR131-1	5':TCGCAGGAAACCAACCTCAA	20
	TR131-2	5':GCGTGATCGACTCGAAGACC	20
MATR-7	TR30-1	5':CCGAGGAAGAGACGAAACCC	20
	TR30-2	5':TCGTCACCCACAACATGCAG	20
MATR-8	TR57-1	5':CAGGTCCAGGGCATGTTTCC	20
	TR57-2	5':TCCCGATAATCCGTTGCATGAC	22
MATR-9	TR100-3	5':CTGTTGGAGCGCAGCCGTTT	20
	TR100-4	5':ACCCAGTCGTCGACGGTGT	20
MATR-10	TR124-1	5':CGCCTCTGAGCGACAACGAC	20
	TR124-2	5':CGATCCGGTACCCGAAGCCA	20
MATR-11	TR43-1	5':TGGCTGCTGTTCAATTGGATG	21
	TR43-2	5':TCGTCGGTCAATTGCACCTT	20
MATR-12	TR8-1	5':TGATGGCGACCACCGACAAGG	21
	TR8-2	5':TGGATGCGGCCGACCAACA	19
MATR-13	TR91-1	5':CCTCGAAGGTGGCGGACTTG	20
	TR91-2	5':ACCAGGATGGTGCCCAAACC	20
MATR-14	TR92-1	5':TGGTCGCCGCACACCTACT	19
	TR92-2	5':GCCCTTACTGGGCAGGTCCTTC	22
MATR-15	TR93-1-1	5':GGAAGGCAGCAAGGTCAAC	20
	TR93-1-2	5':TCAGGTCCAGCGACAGCTTC	20
MATR-16	TR93-2-1	5':GTGGTCAGCACCCGGAGAGT	20
	TR93-2-2	5':ACCACCGACTGCTCGACCTT	20

(西森ら、動衛研研究報告 第109号:25-32、平成15年3月より)

表2 VNTR領域において含まれるTRの反復数を求める換算表

VNTR領域名	TRのサイズ*	含まれるTRの反復数** ;								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
MATR-0	195		335	530						
MATR-1	53	228	281	334	387	440	493	546	599	652
MATR-2	53	194	247	300	353	406	459	512	565	618
MATR-3	53	195	248	301	354	407	460	513	566	619
MATR-4	53	168	221	274	327	380	433	486	539	592
MATR-5	58	133	191	249	307	365	423	481	539	597
MATR-6	58	210	268	326	384	442	500	558	616	674
MATR-7	57	220	277	334	391	448	505	562	619	676
MATR-8	57	106	163	220	277	334	391	448	505	562
MATR-9	55	325	380	435	490	545	600	655	710	765
MATR-10	55	176	231	286	341	396	451	506	561	616
MATR-11	55	284	339	394	449	504	559	614	669	724
MATR-12	57	371	428	485	542	599	656	713	770	827
MATR-13	56	235	291	347	403	459	515	571	627	683
MATR-14	58	215	273	331	389	447	505	563	621	679
MATR-15	57	194	251	308	365	422	479	536	593	650
MATR-16	59	241	300	359	418	477	536	595	654	713

* : 縦列反復する1単位の塩基数 (b p)、TRのコンセンサス配列の長さ。

** : PCR増幅産物から推測されるTRの反復数。実際は整数値とならない。四捨五入した値。

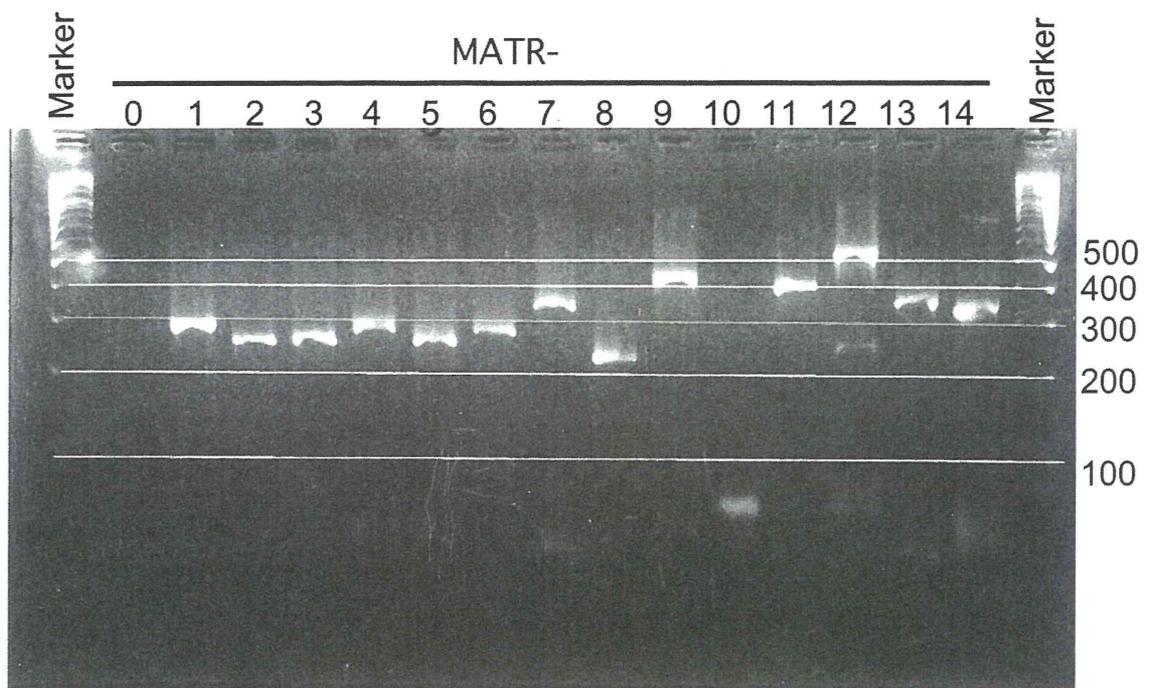
(西森ら、動衛研研究報告 第109号:25-32、平成15年3月より)

表3 患者および循環風呂の濾材由来の *M. avium* のアレルプロファイル

Primer No.	患者由来菌			循環式24時間風呂の濾材由来								
	K-69			K-61			K-62			K-63		
	実測値	換算値	TR数	実測値	換算値	TR数	実測値	換算値	TR数	実測値	換算値	TR数
1	323	334	2	274	281	1	273	281	1	281	281	1
2	294	300	2	242	247	1	293	300	2	292	300	2
3	242	248	1	244	248	1	243	248	1	244	248	1
4	265	274	2	269	274	2	266	274	2	269	274	2
5	243	249	2	246	249	2	245	249	2	244	249	2
6	317	326	2	266	268	1	326	326	2	318	326	2
7	322	334	2	327	334	2	327	334	2	320	334	2
8	217	220	0	219	220	0	220	220	0	215	220	0
9	401	435	2	404	435	2	406	435	2	402	435	2
11	385	394	2	387	394	2	382	394	2	387	394	2
12	509	485	2	507	485	2	505	485	2	503	485	2
13	336	347	2	340	347	2	335	347	2	333	347	2
14	326	331	2	327	331	2	379	389	3	381	389	3
15	296	308	2	297	308	2	296	308	2	297	308	2
16	405	418	3	402	418	3	406	418	3	406	418	3

表4 *M. avium* 50株のアレルプロファイル

試料名	MATR locus																由来
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16		
1 K-7	2	1	1	2	2	1	2	2	3	2	2	0	2	2	3	循環式浴槽	
2 K-8	1	1	1	2	2	1	1	1	3	1	2	0	2	2	2	循環式浴槽	
3 K-16	2	1	1	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	3	循環式浴槽	
4 K-17	2	0	5	2	2	2	6	0	3	2	3	2	2	2	3	循環式浴槽	
5 K-18	2	1	1	1	3	2	0	2	0	2	3	0	2	2	3	循環式浴槽	
6 K-21	1	0	1	2	2	2	2	2	2	2	3	0	3	2	3	循環式浴槽	
7 K-27	1	1	1	2	2	1	1	1	3	1	3	0	2	2	2	循環式浴槽	
8 K-31	1	1	1	2	2	1	1	1	3	1	3	0	3	2	2	循環式浴槽	
9 K-57	2	0	1	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3	濾材	
10 K-61	1	1	1	2	2	1	2	0	2	2	2	2	2	2	3	濾材	
11 K-62	1	2	1	2	2	2	2	0	2	2	2	2	3	2	3	濾材	
12 K-63	1	2	1	2	2	2	2	0	2	2	2	2	3	2	3	濾材	
13 K-65	5	0	4	5	4	2	1	5	0	3	0	0	2	2	0	循環式浴槽	
14 K-66	2	0	5	2	2	2	2	3	2	1	2	2	2	2	3	循環式浴槽	
15 K-67	1	1	2	2	2	1	5	2	2	1	3	0	3	2	3	循環式浴槽	
16 K-68	1	1	2	2	2	1	5	2	2	1	3	0	3	2	3	循環式浴槽	
17 K-69	2	2	1	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	3	ヒト	
18 kirchberg	1	2	3	2	3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	3	鳥	
19 E38686	1	2	3	2	3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	鳥	
20 Flamingo	1	2	3	2	3	1	1	2	2	3	1	1	3	2	2	鳥	
21 蒲生	2	0	5	2	2	1	5	2	2	2	3	2	2	2	3	ヒト	
22 嶋本	1	1	1	2	2	1	1	1	3	1	3	0	3	2	2	ヒト	
23 Elephant	1	2	3	2	3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	3	ゾウ	
24 トリ71	1	2	4	2	3	1	1	2	2	3	1	1	3	2	1	鳥	
25 トリ4110	1	2	3	2	3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	鳥	
26 トリ4121	1	2	3	2	3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	鳥	
27 トリMC	1	2	3	2	3	1	1	2	3	4	1	1	1	2	1	鳥	
28 トリ名59	1	2	3	2	3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	鳥	
29 トリP50	1	2	3	2	3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	鳥	
30 トリP52	1	2	3	2	3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	鳥	
31 トリP53	1	2	3	2	3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	3	鳥	
32 か3	1	1	1	2	2	1	1	1	3	1	2	0	3	2	2	ヒト	
33 か6	1	1	1	2	2	1	1	1	3	1	2	0	3	2	2	ヒト	
34 か14	2	0	1	2	2	2	1	2	3	2	2	2	2	2	3	ヒト	
35 か15	1	0	2	2	2	1	5	2	2	2	3	0	2	2	3	ヒト	
36 か20	2	0	5	2	2	1	4	2	2	2	3	0	3	2	3	ヒト	
37 か22	1	1	1	2	2	1	1	1	3	1	3	0	3	2	2	ヒト	
38 か91	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3	ヒト	
39 か112	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	3	0	3	2	2	ヒト	
40 か113	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	3	0	3	2	2	ヒト	
41 か114	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	3	0	3	2	2	ヒト	
42 か122	1	1	1	2	2	1	1	1	3	1	3	0	3	2	2	ヒト	
43 か123	2	0	3	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3	ヒト	
44 か153	1	0	2	2	2	1	1	2	2	2	3	0	2	2	3	ヒト	
45 か154	1	0	2	2	2	1	1	2	2	2	3	0	2	2	3	ヒト	
46 か156	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	3	0	3	2	2	ヒト	
47 か158	1	0	2	2	2	1	1	2	2	2	3	0	2	2	3	ヒト	
48 か163	1	1	1	2	2	1	1	1	3	1	3	0	3	2	2	ヒト	
49 か173	2	0	1	2	2	1	2	2	2	2	3	0	2	2	3	ヒト	
50 か177	2	0	5	2	2	1	1	2	2	2	3	0	2	2	3	ヒト	



M:100bp DNA ladder marker

2.5%NuSieve3:1 Agarose を使用

図1 *M. avium* のVNTR型別用プライマーを用いたK-61株のPCR増幅産物の電気泳動

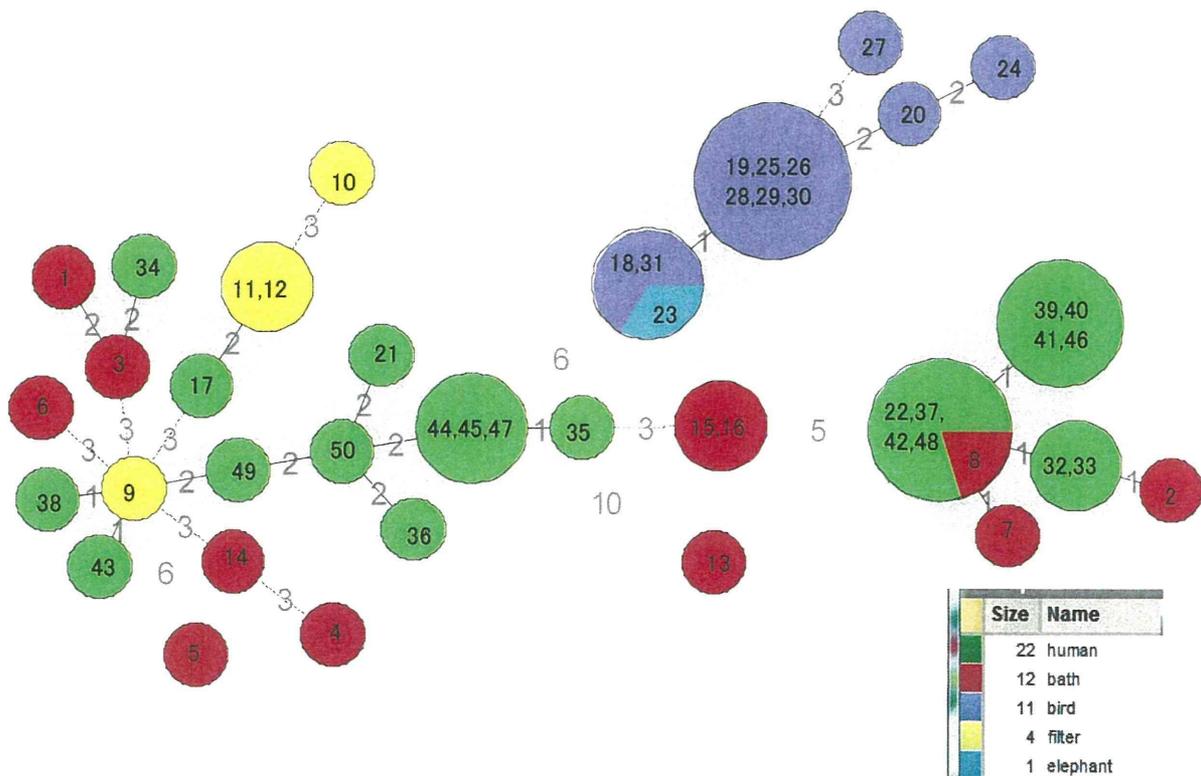


図2 分離源が異なる*M. avium*のMinimum spanning tree

感染の地域性とその原因

研究分担者 磯部 順子 富山県衛生研究所

研究要旨 富山県におけるレジオネラ症報告数の地域差の原因を明らかにするため、平成18～22年の5年間に得られた浴用水の状況とそれらから分離されたレジオネラ属菌を対象に地域間の特性を比較した。その結果、レジオネラ症報告数の多い西部では、患者から分離される頻度の高い *L.p.SG1 (lag-1+)* が遊離残留塩素濃度の高い浴用水から分離されていることが明らかとなった。このことから、塩素消毒により *L.p.SG1 (lag-1+)* が選択的に生残り、結果として感染の確率を高めている可能性が推察された。

A. 研究目的

レジオネラ症については、感染様式やレジオネラ属菌の病原性など解明されていないことが多い。一方、富山県ではレジオネラ症患者の発生が地域（東西）で著しい差が認められる。そこで、おもな感染源の一つである浴用水の地域性を比較することで、患者発生状況の地域差の原因を明らかにし、さらにレジオネラ症の発生に浴用水がどのように関わっているかを明確にすることを目的とする。

B. 研究方法

調査は、平成18～22年の5年間の浴用水のレジオネラ汚染実態調査で得られた浴用水の性状とそれらから分離されたレジオネラ属菌を対象に行った。データは東部(E)（朝日町・魚津市・上市町・黒部市・立山町・富山市・滑川市・入善町）と西部(W)（射水市・小矢部市・高岡市・砺波市・氷見市・南砺市）に大きく分けて比較した。はじめに浴用水から分離されたレジオネラ属菌と浴用水の遊離残留塩素濃度（残塩）

などの特性との関連性を調べた。次に、患者から分離される *Legionella pneumophila* Serogroup 1(L.p.SG1)との関連が報告されている *lag-1* 遺伝子について、患者24名および浴用水55件から分離された *L.p.SG1* における保有状況を調べた。

① 患者の発生動向調査資料

富山県感染症情報センターで1999～2010年の12年間に収集、解析されたデータを用いた。

② 浴用水の状況調査

県内の公衆浴場およびスポーツ施設96施設の浴用水260件（東部122件、西部138件）について調査した。採水は厚生センターおよび浴用施設に協力を依頼した。おもな調査項目はpH、残留遊離塩素濃度（残塩）と、一部の浴用水については、従属栄養細菌数についてしらべた。

③ 供試菌

患者株は医療機関あるいは当所で、また、浴用水株は当所で分離した。血清型はレジオネララテックステスト（OXIDO）とレジ

オネラ免疫血清（デンカ生研）による凝集反応で決定した。また、患者からの分離株 25 株はレファレンス事業として感染症研究所に送付し、Monoclonal Antibodies (MAb) 型別、SBT (Sequence-Based Typing analysis) 型別を依頼した。

④ *lag-1* 遺伝子は Kozak らの報告 (J.Clinical Microbiology 2009 vol.47, 82525-2535) したプライマー lag-F: 5'-CTC ACAACAAGTCAAGCAAC-3' および lag-R: 5'-AAACCATACCAAAGCAAC AT-3' を用い、GoTaqHS (プロメガ) 10 μ l に lag-F、lag-R (2 μ M) をそれぞれ 1 μ l、テンプレート 2 μ l を加え、20 μ l になるよう H₂O を加え反応液とした。PCR は 95°C 2 分、94°C 30 秒、95°C 30 秒、72°C 1 分を 30 サイクル、72°C 5 分で thermal cycler DICE (takara) でおこなった。

C. 研究結果

【患者発生動向】1999～2010 年に富山県で報告されたレジオネラ症患者は 126 名で、集団発生はなかった(表 1)。市町村別の人口 10 万人対の患者発生状況を図 1・表 2 に示した。高岡市が 24.5 と最も多く、次いで氷見市 21.4、富山市 10.7、射水市 10.6 の順であった。全体で見ると、東部 8.5、西部 15.1 と西部で高かった。これらの感染源はいずれも特定されていないが、潜伏期間に公衆浴場や温泉施設等を利用し、感染源として浴用水が強く疑われた事例は東部で 19/56 例(33.9%)、西部で 31/69 例(44.9%) と西部で高かった。しかし、これらの施設を利用していないことが明らかな事例も西部では 14/69 (20.3%) と東部 6/56 (10.7%) より高かった。

【地域別にみた浴用水の特徴とレジオネラ

属菌分離状況】

表 3 に、レジオネラ属菌が分離された浴用水数を血清型毎に残塩別で示した。また、レジオネラ属菌が分離された浴用水の残塩を血清型別にプロットした(図 2)。東部については、レジオネラ属菌が分離された浴用水は 55/122 件(45.1%)で、うち L.p.SG1 が分離されたのは 20/55 件(36.4%)と最も多く、ついで L.p.SG6 の 18/55 件(32.7%)、L.p.SG5 の 12/55 件(21.8%)であった。西部については、レジオネラ属菌が分離された浴用水は 58/138 件(42.0%)で、うち L.p.SG1 が分離されたのは 34/58 (58.6%)と最も多く、ついで L.p.SG6 の 18/58 件(31.0%)、L.p.SG5 の 15/58 件(25.9%)であった。これらを残塩別で見ると、東部では 0.2mg/L 未満で 17 血清型が分離され、それらのうち L.p.SG6 が 11 件と最も多く分離された。1.0mg/L 以上は L.p.SG6、SG9 それぞれ 1 件だけであった。西部では 0.2mg/L 未満で 13 血清型が分離され、うち L.p.SG1 が 12 件ともっとも多く分離された。1.0mg/L 以上で分離されたのは 5 血清型で、うち L.p.SG1 が 6 件ともっとも多かった。さらに血清型別に残塩の平均をみると、西部の L.p.SG1 が 0.48mg/L と最も高く、次いで西部の L.p.SG9 が 0.41 mg/L、東部の L.p.SG9 が 0.34 mg/L であった。なお、表の中の *L.pneumophila* については 16SrRNA シーケンスによって推定された血清型であり、1 血清型ではない可能性があることから、参考値と考える。主な血清型 (L.p.SG1,5,6,9) について分離された浴用水の残塩を図 3 にプロットすると、東西間に有意差があるといえないまでも、残塩の高い浴用水は西部に多いことは明らかで

ある。残塩以外に東西で差がみられる性状、例えば分離されたレジオネラ属菌数や従属栄養細菌数などについて比較したが、差は認められなかった(図 4,5)。

【*lag-1*遺伝子を保有する L.p.SG1 の分離状況に関する地域差】

患者 24 名から分離されたレジオネラ属菌 27 株の内訳を表 4 に示した。分離されたのは L.p.SG1 が 22 株、L.p.SG4 が 2 株、そして L.p.SG2、SG3、*L.felexii* がそれぞれ 1 株であった。患者 No.2 からは L.p.SG1 と L.p.SG4 の 2 血清型が分離され、さらにこの L.p.SG4 は 2 つの SBT 型を示した。また、患者 No.16 からは 2 つの ST を示す SG1 が分離された。L.p.SG1 22 株のうち、*lag-1* 遺伝子を保有していたのは 21 株(95.5%)であった。保有しなかった 1 株は患者 No.2 の ST278、MAb 型 Bellingham と決定された株であった。一方、33 施設 55 浴用水から分離された L.p.SG1 の *lag-1* 遺伝子の保有率は、東部が 10/20 件(50.0%)、西部が 16/35 (45.7%) で、わずかに東部で保有率が高かった。これらを残塩について見ると、*lag-1* 遺伝子を保有する L.p.SG1 (lag-1+) が分離された浴用水の残塩は東部で平均 0.28mg/L、西部で 0.55mg/L、*lag-1* 遺伝子を保有しない L.p.SG1(lag-1-)が分離されたのは東部で 0.29mg/L、西部では 0.43mg/L であった。東西いずれも *lag-1* 遺伝子の保有と残塩には関連性は認められなかった。しかしながら、全体的には有意差は認められないものの、残塩 1.0mg/ml 以上の浴用水では 5/6 (83.3%) から L.p.SG1 (lag-1+) が分離されていた(図 6)。そして、これらはすべて西部地域の浴用水であった。

D. 考察

富山県におけるレジオネラ症の報告数は全国とくらべても多く、人口 10 万人対の値は常に上位に位置している。これを日常的に文化・経済的な観点から県を大きく東西に分けた地域(東部/西部)でその発生動向をみると、レジオネラ症報告数は明らかに西部で多い。そして、人口に対する発生数は西部、中でも高岡市と氷見市が極めて多くなっている。この原因のひとつとして、肺炎患者に対し、レジオネラ症検査を実施する医師が多いという背景が考えられた。そこで東西それぞれ 4 か所のおもな医療機関におけるレジオネラ尿中抗原検査数を調査したところ、検査数は東部で多く、それぞれの人口に相関する結果であった(図 7)。すなわち、レジオネラ症の地域差は、医療機関のレジオネラ症に対する意識の差とは考えられなかった。そこで、患者から分離されるレジオネラ属菌の 8~9 割を占め、もともと重要な血清型となっている L.p.SG1 に着目して、浴湯水における東西間の相違点を調査した。レジオネラ属菌が分離された浴用水の割合に地域差は認められなかったものの、それらに対する L.p.SG1 の分離率は東部 36.4%に対し、西部は 58.6%と西部で高かった。そして、興味あることに、L.g.SG1 が分離された西部の浴用水のうち、1.0~1.8mg/L という高い残塩を示したのは 6/34 件(17.6%)で、さらに、このうち 5/6 株(83.3%)が *lag-1* 遺伝子を保有していた。そして、東部には L.p.SG1 と残塩にこのような関連は認められなかった。*lag-1* 遺伝子は、先にも述べたが、患者から分離される L.p.SG1 が優位(95.0%)に保有することから、レジオネラ症に深く関連する因子で

あると報告されている。西部でレジオネラ症患者が多く報告される一つの原因として、残塩の高い浴湯水から *lag-1* 遺伝子を保有する L.p.SG1 が分離されることが考えられる。塩素消毒により浴用水の中で L.p.SG1 だけが、しかもレジオネラ症に深く関与する *lag-1* 遺伝子を保有する株が選択的に生残する状態となり、感染確率を高めているのではないかと推定するものである。このことは、すなわち、近年のレジオネラ症患者の増加原因のひとつとして、残塩に耐えて生息する *lag-1* 遺伝子保有 L.p.SG1 の増加が関連しているのではないかと思われる。現在、浴用水の衛生管理基準は、すべてのレジオネラ属菌を対象としている。そして、*L.londiniensis* など、ヒトへの感染性が明らかになっていないレジオネラ属菌が分離された浴用水についても、L.p.SG1 などヒトへの感染性が明らかなレジオネラ属菌も生息する可能性が高いと考えられることから消毒することが望ましい。しかしながら、今回の調査結果は、高い塩素濃度による消毒が、L.p.SG1(*lag-1+*)だけを生残させるリスクを高める場合があることを示すものである。

E. 結論

以上の結果から、浴用水の衛生管理を塩素剤だけに頼ることはきわめて危険であり、今後、塩素剤を用いない衛生管理手法を併用すべきと思われる。そのためには、効率的な塩素剤の使い方など、浴用水の衛生管理基準や管理方法については検討が必要である。また、衛生管理の指標としてレジオネラ属菌すべてを対象とすべきかなど、より多くの浴用水での検討が必要と思われた。

謝辞 本実態調査を実施するにあたり、

富山県生活衛生課、各厚生センター、富山市保健所の担当者および採水にご協力いただいた浴用施設の皆様に深謝いたします。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 富山県におけるレジオネラ症報告数年次推移

	1999		2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010		計	
	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女	男	女
40歳未満																								0	0	
40-49							1						1		3		1				1		1		8	0
50-59			1		1				1	1	1		2	1	5		1	1	2	1	3		2		19	4
60-69	1												3		7		4		4	1	10	1	8		37	2
70-79			1					2				4		5		4		7		3		5	1	31	1	
80以上			1		1						1				2	1	2	2	2	1	3	2	5	1	17	7
年次別性別合計	1		3		2		1		3	1	2		10	1	22	1	12	3	15	3	20	3	21	2	112	14
年次別合計	1		3		2		1		4		2		11		23		15		18		23		23		126	

表2. 人口10万対人レジオネラ症報告数

		報告数	人口10万人対報告数
東部	富山市	45	10.7
	魚津市	4	8.9
	上市町	2	9.1
	立山町	1	3.7
	入善町	1	3.7
	滑川市	1	3.0
	黒部市	0	0.0
	舟橋村	0	0.0
	朝日町	0	0.0
西部	高岡市	43	24.5
	氷見市	11	21.4
	射水市	10	10.6
	砺波市	3	6.1
	小矢部市	1	3.2
	南砺市	1	1.8
その他*		3	
		126	

* その他には県外の患者および住所不明の患者が含まれる

図1. 人口10万人対市町村別レジオネラ症報告数

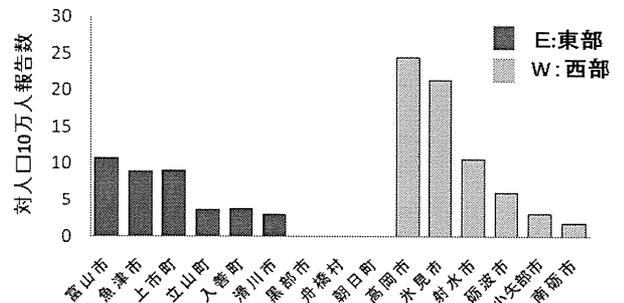
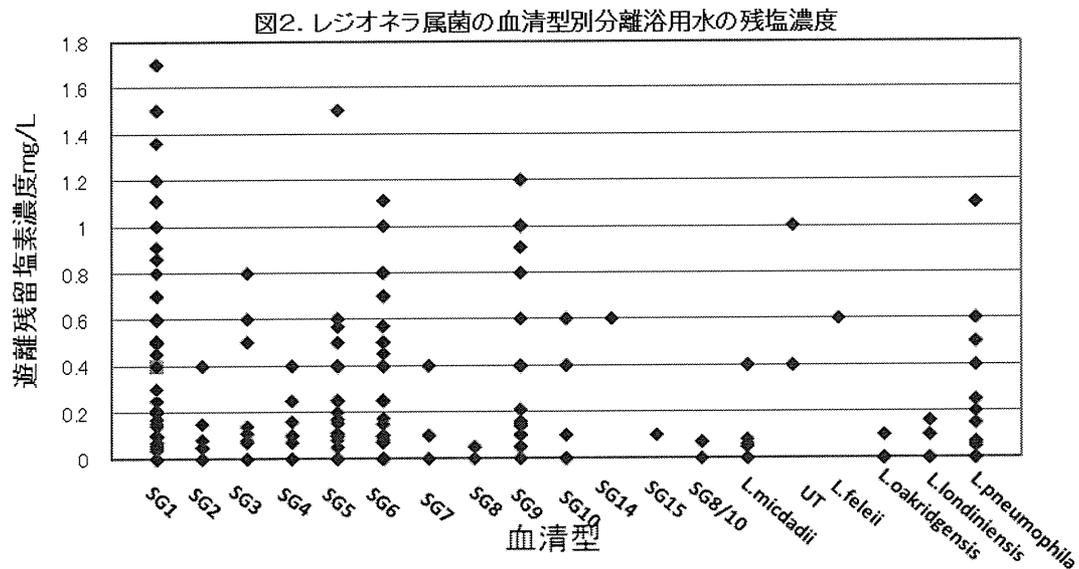


表3 分離されたレジオネラ属菌の遊離残留塩素濃度別浴用水数(東西別)

	EAST (119件)					WEST (142件)					total
	0 ≤ ~ < 0.2	≥ 0.2 ~ < 1.0	1.0 ≤	subTotal	平均残塩	0 ≤ ~ < 0.2	≥ 0.2 ~ < 1.0	1.0 ≤	subTotal	平均残塩	
L.p.SG1	8	12		20	0.29	12	17	6	35	0.49	55
L.p.SG2	3			3	0.02	3	1		4	0.17	7
L.p.SG3	5			5	0.28	5			5	0.18	10
L.p.SG4	6	1		7	0.07	3	1		4	0.15	11
L.p.SG5	7	5		12	0.2	9	5	1	15	0.26	27
L.p.SG6	11	6	1	18	0.26	8	9	1	18	0.33	36
L.p.SG7	1	1		2	0.2	1			1	0.1	3
L.p.SG8	1			1	0	1			1	0.05	2
L.p.SG9	4	4	1	9	0.34	6	3	2	11	0.41	20
L.p.SG10	3	3		6	0.25				0		6
L.p.SG14				0					0	0.6	0
L.p.SG15	1			1	0.1				0		1
SG8/10	1			1	0	2			2	0.07	3
L.micdadii	3	1		4	0.1	3	1		4	0.15	8
L.feelii				0			1		1	0.6	1
L. busaneis	1			1	0				0		1
L.oakridgensis	7			7	0.01				0		7
L.londiniensis	4			4	0.03	1			1	0.16	5
L.pneumophila	4	2		6	0.14	5	2	1	8	0.35	14
Total	70	35	2	107	0.13471	59	40	11	110	0.271333	217

表 4. 患者分離株内訳

患者No.	年	血清型	ST	Mab	性別	年齢	利用施設	東西
1	2003	SG1	642	Knoxville	女	55	不明	W
2	2004	SG4	392	Bellingham	男	81	温泉利用	W
		SG1	643					
3	2005	SG1	278	Bellingham	男	56		W
4	2005	SG1	502	Benidorm	男	70	公衆浴場等を利用	W
5	2006	SG1	505	Benidorm	男	57	利用なし	W
6	2006	SG1	353	Knoxville	男	63	温泉利用	W
7	2006	SG1	506	Allent/France	男	43	利用なし	W
8	2006	SG1	507	Benidorm	男	64	利用なし	W
9	2006	SG1	505	Benidorm	男	75	利用なし	E
10	2006	SG3	120	Benidorm	男	53	温泉利用	E
11	2006	SG2	508					
12	2006	SG1	39		男	64	温泉用	W
13	2007	SG1	505	Benidorm	男	55		W
14	2008	SG1	384	Benidorm	男	70		W
15	2008	SG1	505	Benidorm	男	81		W
16	2008	SG1	644	Benidorm	男	78	温泉利用	W
			505	Benidorm				
17	2008	SG1	132	Allent/France	男	67	温泉利用	W
18	2008	SG1	2	Benidorm	男	58	温泉利用	W
19	2009	SG1	682	Benidorm	男	66	4か所の公衆浴場	W
20	2009	SG1		Allent/France	男	68	温泉	W
21	2009	<i>L. feeleii</i>			男	84	利用なし	E
22	2009	SG1	42	Benidorm	男	49	温泉	W
23	2010	SG1	644		男	61	温泉利用	W
24	2010	SG1			男	61	不明	W



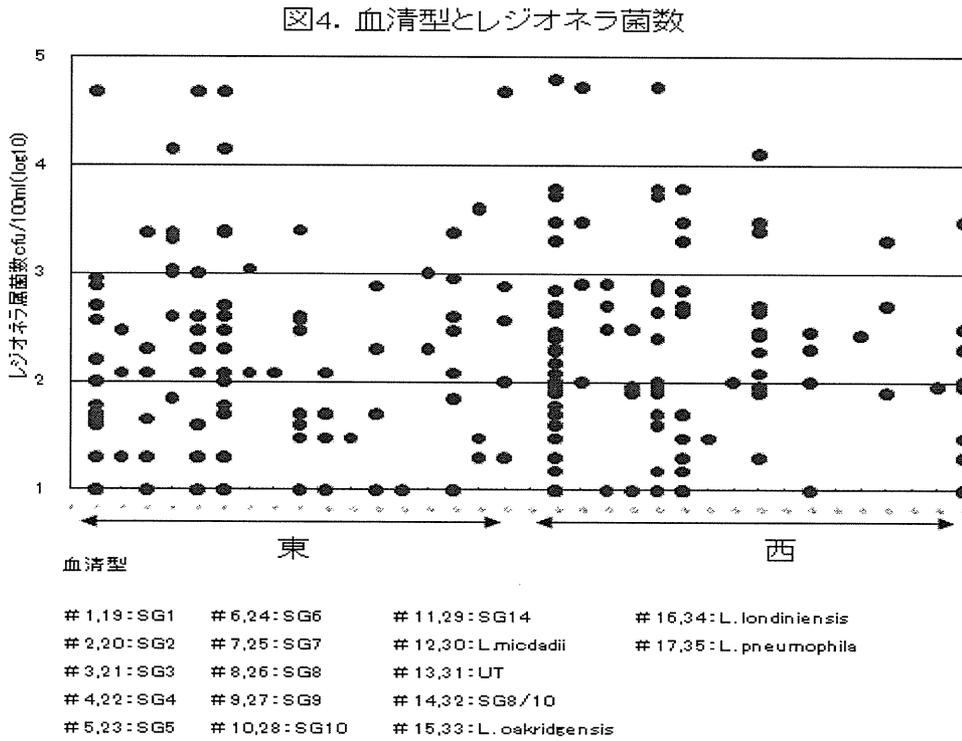
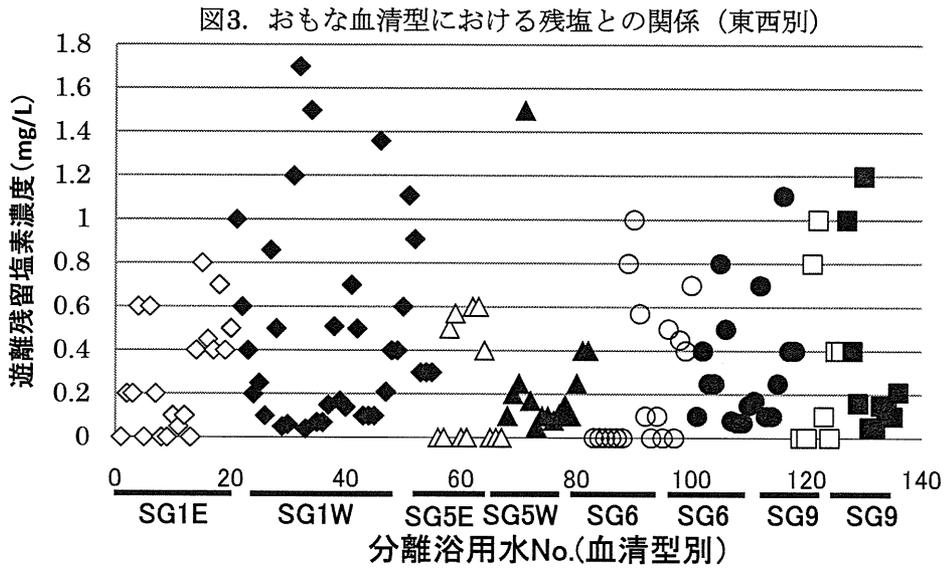


図5. 従属栄養細菌数と血清型の関連(東西別)

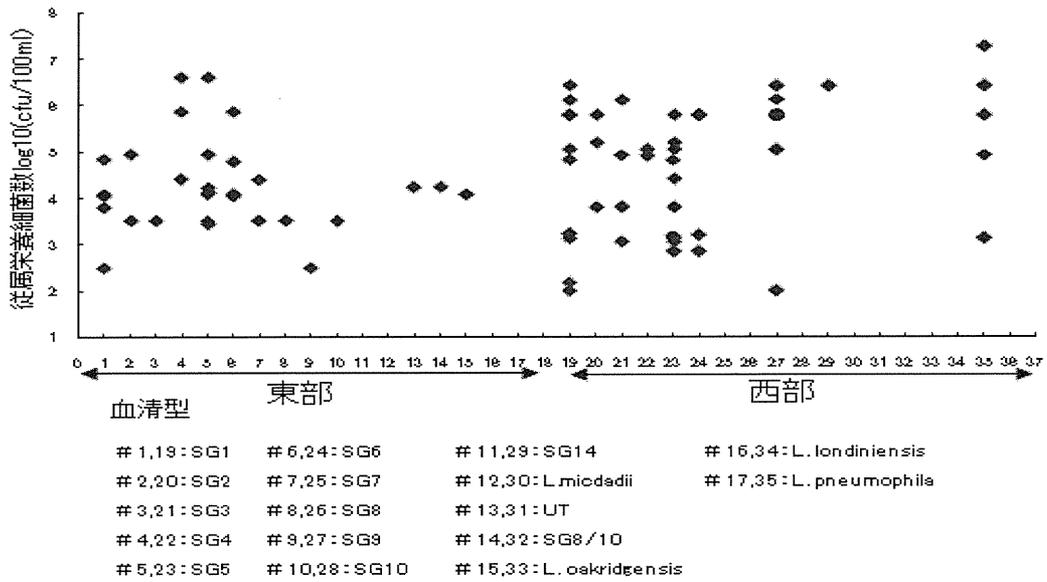


図6. 残塩濃度と lag-1 遺伝子保有 L.p.SG1 の東西比較

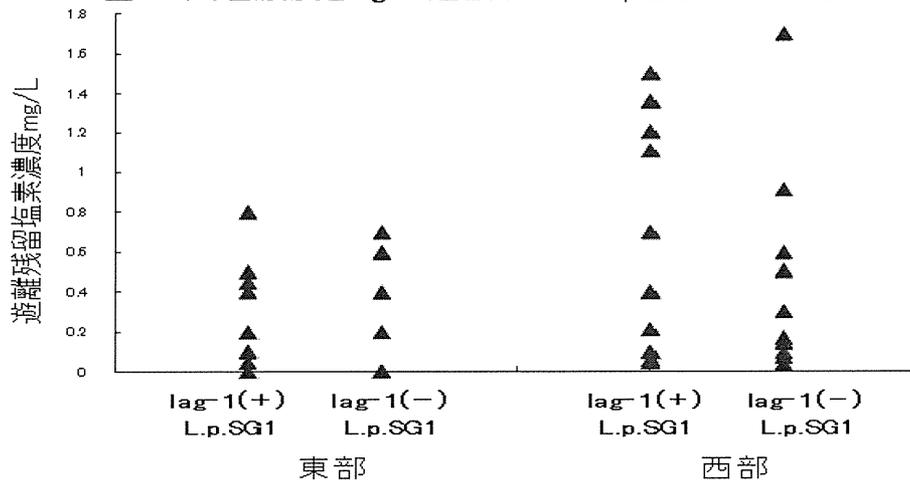
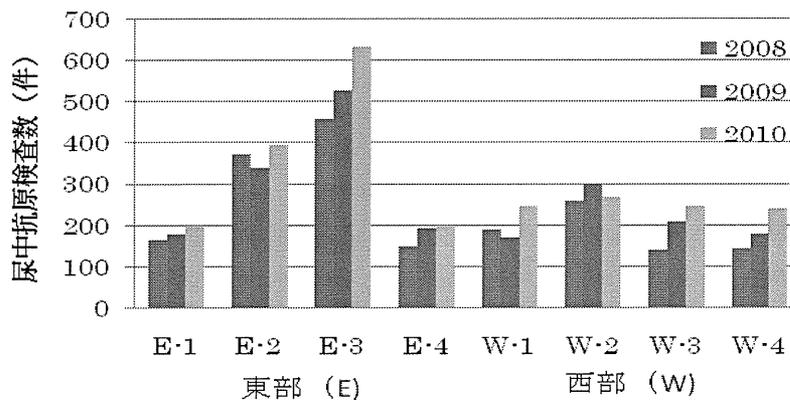


図7. おもな医療機関の尿中抗原検査数



レジオネラ属菌対策等に係る宿主アメーバの管理
— レジオネラ属菌以外の微生物とアメーバの共生実態について—

分担研究者 八木田健司 国立感染症研究所 寄生動物部、
協力研究者 同部 泉山信司

概要

環境中に生息する *Acanthamoeba* を対象に、ギムザ染色で細胞内の共生微生物(共生体)が確認された共生アメーバのDNAアーカイブ標本を材料として、遺伝子解析による共生体の同定を行った。調べた浴槽水試料ならびにハウスダスト試料からは、共生アメーバが 22 株検出され、16SrRNA のシーケンス解析に基づく同定の結果、14 株の共生体がクラミジア類に分類され、ヒトの呼吸器疾患との関連性が知られる *Parachlamydia* 科と相同性が一致する共生体も含まれた。また桿菌様の共生体も検出され、細胞内寄生性が知られるリケッチア属のものも含まれた。ほとんどの共生体との関係において、共生アメーバは安定した共生関係を維持しているものと考えられ、アメーバに対する病原性は極めて低いものと想定された。今後は *Parachlamydia* 科の共生体を中心に、アメーバ共生体のヒトの健康に及ぼす影響に関するエビデンスの蓄積が重要と考えられた。

A.研究目的

環境中に生息する *Acanthamoeba* 等の自由生活性アメーバは、病原細菌であるレジオネラ属菌の自然宿主として知られており、宿主アメーバ類の生態がレジオネラ感染症の成立に大きく影響を及ぼしている。一方で、レジオネラ属菌以外にも自由生活性アメーバを宿主として、共生/寄生する微生物が多数存在することが近年、明らかとなっている。特に、クラミジアに近縁の *Parachlamydia* は、*Acanthamoeba* の共生微生物であると同時に、ヒトの呼吸器疾患の病原体となりうることが示唆されており、アメーバ共生微生物のヒト健康影響の問題が新興感染症の観点から議論されている。本研究は、国内ではほとんど研究されていないこの問題に関して、アメーバ共生微生物の実態調査を行い、共生微生物の特定およびそれらのヒトの健康への関与の可能性を明らかにすることを目的とする。

B.研究方法

アメーバの分離と培養:

自由生活性アメーバ類の生態とヒトの生活様式との関係を考慮し、浴槽水あるいはハウスダストをアメーバの採取材料とした。アメーバ分離は大腸菌塗布寒天培地を使用し、30℃で培養した。なお、浴槽水試料分離株は平成 12 年から 15 年、ハウスダスト分離株は平成 5-6 年の調査で分離されたもので、共生体を持つことをギムザ染色で確認後、一部は培養株として保存し、残りはDNA試料の形でアーカイブ標本として保存した。

顕微鏡標本の作製と染色による共生体の検出:

無菌培養株を 15ml 遠心管に回収し、1,000xg、5 分間の遠心後に上清の培地を除去した。5ml の PBS でペレットを再浮遊し再び 1,000xg、5 分間の遠心し、上清を除去した。ペレットを 100 μ l の PBS に再浮遊し、その 5 μ l をスライドグラスに径 1cm ほど

の円となるように塗り広げ10-15分間風乾した。その後メタノール(99.5%)で3分間固定し、再び風乾し染色用標本とした。染色はpH7.3のバッファーで希釈調整したギムザ染色液を用い、同液で30分間アメーバ標本を染色した。水道水中で脱色しつつ、細胞内の構造の染色性が良好になった時点で染色標本を乾燥させた。顕微鏡観察は1,000倍の倍率で行った。

DNA抽出:

ギムザ染色により共生体の存在が示されたアメーバ株は、2)の場合と同様にしてPBSで遠心洗浄し、ペレットは100 μ lのPBSに再浮遊した。これを材料としてSDSおよびフェノ・クロ抽出あるいはQIAamp DNA mini kit(QIAGEN)を用いてDNAを抽出、精製し100 μ lのTEバッファーに溶出した。

PCR

Chlamydiales 関連の共生体DNAを増幅する以下のプライマーを用いた。

(Appl. Environ. Microbiol., 70:3346-3351, 2004より)
CCF:5'-CCTCGGGTTGTAAAGCACTTTTCGC
CCR:5'-CCCCGTCAATTCTTTTGAGTTT

(Microbiology, 145:411-417, 1999より)
FOR2:5'-CGTGGATGAGGCATGCAAGTCGA
REV2:5'-CAATCTCTCAATCCGCCTAGACGTC
TTAG

温度反応条件は以下のように設定した。

・CCF/CCRの場合

94C, 3min → ①94C, 30sec → ②65C, 30sec →
③72C, 30sec, ①~③を40cycles → 72C, 3min

・FOR2/REV2の場合

94C, 3min → ①94C, 30sec → ②72C, 30sec →
③72C, 30sec, ①~③を40cycles → 72C, 3min
とした。

シーケンス解析および系統解析

BLASTを用いてGeneBankに登録されたデータに対する相同性の比較を行った。系統解析はCLUSTAL Wを用いた。

C.

研究結果

共生体の検出と遺伝的同定

温泉浴槽水等の温水環境より分離したアメーバは75株で、ギムザ染色によりそのうち9株に球菌様の共生体を認めた。またハウスダストより分離したアメーバ59株の中に、ギムザ染色により13株に球菌様あるいは桿菌様の共生体を認めた。以下、PCR増幅産物のシーケンスとGeneBankの登録シーケンスの相同性比較の結果をまとめた。

1) Parachlamydiaceae bacterium CRIB38:

浴槽水分離のアメーバ5株(T49, MZ7, MZ21, MZ23およびYZx)のCCF/CCR増幅産物が99または100%の相同性を示した。共生アメーバのギムザ染色像を図-1AおよびBに示した。レジオネラ属菌がvacuole内において密に増殖するのとは異なり、その分布は細胞質全体に分散する傾向にあった。ほぼすべてのアメーバで共生が見られその割合は高かった。共生アメーバ内に充満するような増殖形態は認められず、またアメーバ自体は核がしっかり染色され細胞としての機能を失っておらず、脆弱性もみられず、アメーバに負担の少ない共生関係にあるものと推察された。なお、本共生体を有する共生体のアメーバのうち3株(MZ7, 21および23)は、2002年の宮崎におけるレジオネラ集団感時に環境調査で対象施設より分離されたもので、これら宮崎県分離株に加え温泉排水より分離された共生アメーバ1株(T49)を現在まで継代培養(温泉排水株は無菌培養に成功)している。

2) Neochlamydia sp. CRIB37:

ハウスダスト分離のアメーバ1株(D43)のCCF/CCR増幅産物が100%の相同性を示した。Parachlamydiaceae bacterium CRIB38と同様に、共生アメーバ内に充満するような増殖形態は認められず、またアメーバ自体の脆弱性もみられず、アメーバに負担の少ない共生関係にあるものと推察された(図-1C)。

3) Criblamydia sequanensis:

浴槽水分離のアメーバ4株(G5, F39, M21, Z32)のFOR2/REV2増幅産物が82%の相同性を示した。本共生体もアメーバ内に充満するような増殖形態は認められず、またアメーバ自体の脆弱性もみられず、アメーバに負担の少ない共生関係にあるものと推察された(図-1D)。

4) Endosymbiont of *Acanthamoeba* sp. R18:

ハウスダスト分離の 3 株 (D27, D29, D33) の CCF/CCR 増幅産物が 99 あるいは 100% の相同性を示した。共生体は細胞質に分散してその密度は低く、形態は Parachlamydiaceae に近似して球菌様であった。宿主アメーバの脆弱性はみられなかった (図-1E)。

5) Endosymbiont of *Acanthamoeba* sp. UWC22:

ハウスダスト分離の 1 株 (D34A) の CCF/CCR 増幅産物が 100% の相同性を示した。共生体は Endosymbiont of *Acanthamoeba* sp. R18 に似て細胞質に分散してその密度は低く、形態も同様であった。宿主アメーバの脆弱性はみられなかった (図-1F)。

6) *Propionibacterium acnes*:

ハウスダスト分離の 5 株 (D2, D5, D10, D42, D50) の CCF/CCR 増幅産物が 100% の相同性を示した。本共生体は桿菌様の形態を示し、細胞質内に分散するように存在した。細胞内の増殖密度はかなり高くなる場合があるが、アメーバ核の存在ははっきりしており、共生関係が成立していることが推察された (図-1G)。

7) *Sinorickettsia chlamys* :

ハウスダスト分離の 2 株 (D7A, D53) の CCF/CCR 増幅産物はすべて一致して 81% の相同性を示した。本共生体は桿菌様の形態を示し、細胞質内に分散するように存在した。細胞内の増殖密度はかなり高くなる場合があり、その場合アメーバ核の存在が不明瞭で、レジオネラ属菌感染の後期、即ち菌の細胞内増殖によりアメーバは細胞としての機能消失した状態に相似していた (図-1H)。

8) *Methylophilus* sp.:

ハウスダスト分離の 1 株 (D24) が 99% の相同性を示した。共生アメーバのギムザ染色像を図-x に示した。本共生体は *Propionibacterium acnes* と同様桿菌様で、他の共生体ではアメーバ共生がほとんどのアメーバ細胞で見られるのに対し、本共生アメーバの割合は極めて低かった (図-I)。

Parachlamydiaceae bacterium CRIB38 と他のクラミジア科の系統解析

本研究で検出された宮崎県分離の共生体と高い相同性を示した Parachlamydiaceae bacterium CRIB38 と他のクラミジア科との 16S

ribosomal RNA 遺伝子に基づく系統解析を図-2 に示した。Parachlamydiaceae bacterium CRIB38 はこれまでヒトの呼吸器疾患に関連することが示唆されているクラミジア科微生物との密接な関連性が示された。

D. 考 察

環境中の *Acanthamoeba* には多様な微生物が共生していることが知られている。近年、アメーバ共生のクラミジア類の分類が進展し、くつかの *Parachlamydia* 科微生物がヒトの呼吸器疾患と関連性があることが明らかになりつつある。本研究で Parachlamydiaceae bacterium CRIB38 と相同性が高かった共生体の検出されたアメーバは、2002 年の宮崎でのレジオネラ集団感染事例の環境調査で分離されたもので、当時の原因究明調査ではレジオネラ、マイコプラズマ、肺炎クラミジア陰性の呼吸器疾患例が多かったことが知られていた。検出された共生体の病原性は不明だが、*Parachlamydia* に関してはヒトマクロファージまたヒト肺細胞を用いた実験的感染および細胞内増殖が認められている他、マウスに対して実験的肺炎が成立することが報告されている。本共生体に関しては無菌培養共生アメーバ株が継代培養されており *in vitro* での病原性試験を今後計画している。また血清疫学的な調査で本共生体と先述のレジオネラ集団感染における原因不明疾患の関連性が解析についても検討を進めている。本研究ではハウスダスト中からもクラミジア類が検出されており、日常生活において周囲の生活環境からこれらの共生体の暴露を受けていることが予想される。急性の呼吸器疾患のみならず、アレルギー等免疫学的慢性的疾患へのこれらの共生体の関わりも想定されるところであり、今後調査すべき課題と思われる。本研究で検出された共生体との関連で、クラミジア以外でヒトの健康影響がみられるのは *Propionibacterium acnes* による関節炎、術後感染があるが、本菌の細胞内寄生性はこれまで不明である。また本菌が皮膚常在性で嫌気性であることから、共生体と *Propionibacterium acnes* の関係に関してはさらに詳細な解析が必要である。

細胞内寄生性はその共生体の潜在的病原性を示す特性であるが、本研究で検出された共生体は *Sinorickettsia* 様共生体を除き、たとえアメーバ内に充満するほどの細胞内増殖をおこしても宿主アメーバを殺すような関係にはないことが示された。レジオネラ属菌はその意味では極めて病原性が高い性質であることが分かる。しかしながら、