

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：84505
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2023
課題番号：19K12376
研究課題名(和文) レジオネラ属菌感染リスク評価のためのアメーバ内動態と菌種間相互作用に関する研究

研究課題名(英文) A Study on amoebic dynamics and interactions in Legionella species for risk assessment of Legionella infection.

研究代表者
中西 典子(Nakanishi, Noriko)

神戸市健康科学研究所・感染症部・副部長

研究者番号：50615490
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：種々の環境における宿主アメーバ類とレジオネラ属菌種間の相互作用の解明を目的に研究を行った。アメーバ類における感染実験により、レジオネラ属菌種間の感染性の違いを見出した。また、*L. pneumophila*における宿主アメーバによる増殖率の差について、宿主アメーバの存在下での遺伝子発現の変動をRNA-seqにより網羅的に解析したところ、アメーバ内侵入後に発現する遺伝子の違いに由来する可能性が示唆された。さらに、冷却塔に定着する*L. pneumophila*が保有するプラスミドはレジオネラの病原性や環境適応に寄与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、環境中でレジオネラが生残していく戦略を明らかにすると共に、それに必要な因子をマーカーとすることで、環境中におけるレジオネラ感染制御法が確立されることが期待される。また、レジオネラ属菌種の病原性獲得機構および生存戦略の解明は、感染リスクの評価や公衆衛生の観点からも重要である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the interactions between host amoeba and Legionella species in various environments. We found differences in infectivity between Legionella species in infection experiment using various amoebae. The difference in the growth rate of *L. pneumophila* in some amoebae was comprehensively analyzed by RNA-seq for the variation in gene expression in the presence of amoebae, suggesting that it may be due to the difference in gene expression after internal invasion within the amoebae. Furthermore, the plasmids possessed by *L. pneumophila* that colonize cooling towers may contribute to the pathogenicity and adaptation to the cooling tower environment.

研究分野：細菌学

キーワード：レジオネラ属菌 宿主アメーバ 感染 相互作用 アメーバ内動態 ゲノム解析 RNA-seq

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レジオネラ属菌は細胞内寄生性を有する病原細菌の一つである。自然界では自由生活性アメーバを自然宿主としており、ヒトに感染すると肺炎マクロファージに感染・増殖し、肺炎を主としたレジオネラ症を引き起こす。国内におけるレジオネラ症は近年増加しており、公衆衛生対策上重要となっている。本邦における感染源としては入浴施設が大多数を占めている。

レジオネラ属菌は50菌種以上あり、ヒトに病原性がある菌種は約30種類知られている。レジオネラ症の起原菌として最も多い *Legionella pneumophila* (以下、*L. pneumophila*) は、環境水中からも効率に検出される。一方で、近年、*L. longbeachae*, *L. micdadei*, *L. dumoffii* 等の別種のレジオネラ属菌が起原菌となっている例も多く報告されている。臨床現場での診断方法として利用される尿中抗原検査が、*L. pneumophila* のみに対応していることを考慮すると、これら他のレジオネラ属菌による報告は過少評価されている可能性がある。

我々は先行研究により、生息場所により分離されるレジオネラ属菌種や遺伝子型が異なっていることを見出している。種々の環境適応には、宿主アメーバ内の動態やレジオネラ属菌種間同士の相互作用が重要な役割を果たしていると考えられるが不明な点が多い。レジオネラ属菌種のアメーバ内での挙動やゲノムワイドな多株比較解析からゲノム上の可動性遺伝領域の構造及び組換えの実態について解析することで、種々の環境でレジオネラが生残していく戦略を明らかにすると共に、それに必要な因子を抽出し、*L. pneumophila* だけでなくレジオネラ属菌の感染リスクを評価することは公衆衛生的に重要である。

2. 研究の目的

本研究では、レジオネラ属菌種のアメーバ内での挙動を分子レベルで解明し、さらに、アメーバ内におけるレジオネラ属菌種間のゲノム上の可動性遺伝領域の構造及び組換えの実態を明らかにすることで、種々の環境に存在する *L. pneumophila* だけでなくレジオネラ属菌の感染リスクを評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アメーバ類の検出

検水 150mL をメンブレンフィルター (孔径 1.2 μm ・直径 25mm) で吸引ろ過し、8等分したメンブレンフィルターを4枚ずつ不活化大腸菌塗布寒天培地に貼り付け、30 と 42 で7日間培養を行った。フィルターから出現したプラークからアメーバを分離し、倒立顕微鏡下でのアメーバの形態と 18S rRNA 遺伝子のシーケンスによりアメーバの種類を同定した。

(2) 菌株：アメーバ類の感染性評価は浴槽水からの分離頻度が高い *L. pneumophila* SG1・SG6・SG9・SG8・SG10, *L. israelensis*, *L. londiniensis*, *L. micdadei* を用いた。冷却塔由来の *L. pneumophila* 25株を用いた。

(3) アメーバ類を用いたレジオネラ感染実験

無栄養寒天培地に不活化大腸菌もしくはレジオネラ属菌を塗布し、各培地に種々の環境から分離したアメーバ類の栄養体をスポットし、30 で培養した。経時的にプラーク域の大きさを測定し、感染性を評価した。また、pMMB207-Km14-GFPc を導入したレジオネラ属菌をアメーバ類

に MOI=1 で感染させ、GFP の発現量によりアメーバ内動態を経時的に観察した。

(4)比較ゲノム解析

Miseq でリードデータを取得し、A5-Miseq によるアセンブリ後に、kSNP を用いて系統解析を行った。また、MinION によりロングリードを取得した。Unicycler を用いて、Miseq のショートリードと併せたハイブリッドアセンブリにより、染色体およびプラスミド DNA の完全長配列を決定した。

(5)RNA-seq 解析

アメーバ存在下での遺伝子発現の変動を把握するため、ゲノム完全長配列を取得済みの浴槽水由来の *L. pneumophila* KL857(ST1) の菌体浮遊液を *Acanthamoeba* sp. と *Hartmannella* sp. 培養プレートに懸濁し、30 分後および 60 分後に回収した菌体から RNA を抽出し rRNA 除去後に RNA-seq 解析を行った。得られたリードデータから edgeR を用いて各遺伝子の TPM を算出し、サンプル間の比較を行った。

4. 研究成果

(1)種々の環境から検出されたアメーバの種類

冷却塔水では *Vermamoeba vermiformis* が最も多く (57.1%)、次いで *Naegleria* 属 (14.3%) であった。公衆浴場水では、*Vermamoeba vermiformis* (29.2%)、*Stenamoeba* 属 (16.7%)、*Hartmannella* 属 (16.7%)、*Naegleria* 属 (14.6%) であった。温泉浴槽水では、*Stenamoeba* 属 (25.9%)、*Acanthamoeba* 属 (20.4%)、*Pharyngomonas* 属 (14.8%) が多く検出され、他にも *Echinamoeba* 属、*Vannella* 属等多様な種類を検出した。

(2) レジオネラ属菌のアメーバ内生存能および増殖能

種々のアメーバ類における感染性評価

アメーバ類におけるレジオネラ属菌種間の感染性に違いが認められた(図1)。特に、レジオネラ症患者から最も分離される *L. pneumophila* は、血清群でやや異なる場合があったが、6 種類のアメーバに感染性を示し、とりわけ *Acanthamoeba* sp.、*Hartmannella* sp.、*Naegleria* sp. に高い感染性を示した。また、*L. micdadei* は、*Acanthamoeba* sp.、*Naegleria* sp.、*Stenamoeba* sp. に高い感染性を示した。一方で、*L. israelensis* は、*Hartmannella* sp. と *Naegleria* sp.、*L. londiniensis* は *Echinamoeba* sp. と *Naegleria* sp. にのみ感染性を示した。このことから、レジオネラ属菌種によって感染・増殖しやすいアメーバ類が存在することが考えられた。

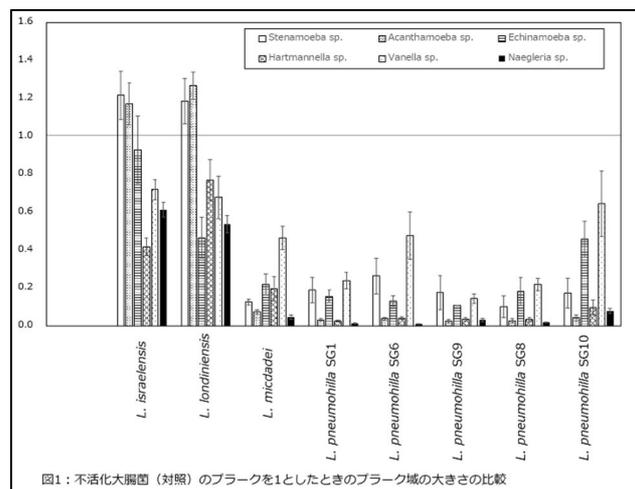
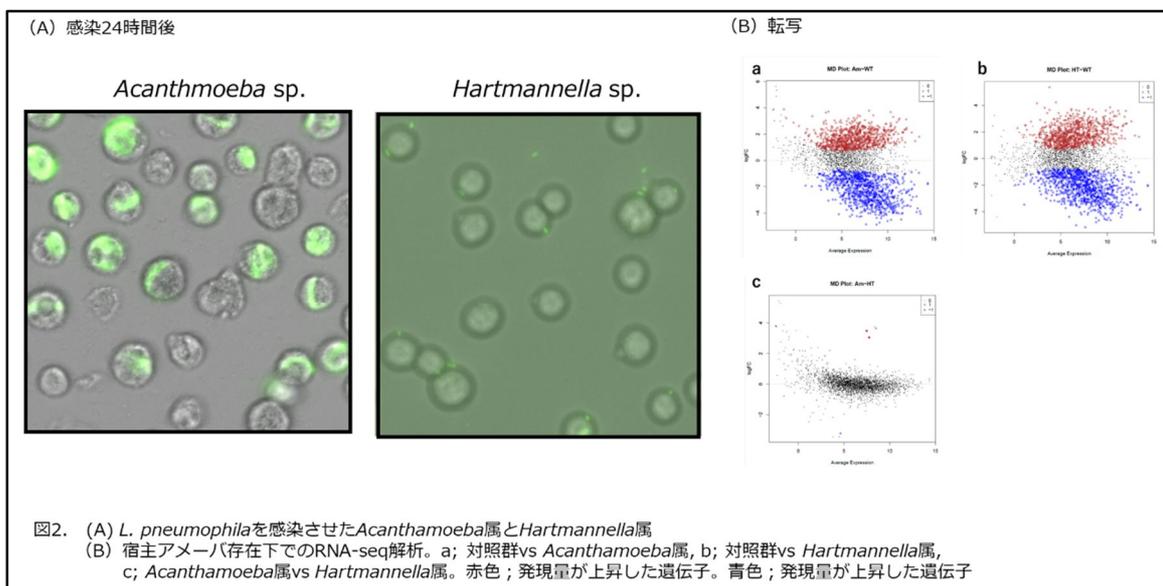


図1: 不活化大腸菌(対照)のブランクを1としたときのブランク域の大きさの比較

L. pneumophila における *Acanthamoeba* sp. と *Hartmannella* sp. 内の動態

L. pneumophila の *Acanthamoeba* sp. と *Hartmannella* sp. との感染性は、上記の方法におい

では同じと考えられたが、感染 24 時間後の菌数を比較すると *Acanthamoeba* sp. では 29 倍の菌量に増加したのに対し、*Hartmannella* sp. では 2 倍程度の増加であり、感染像も異なっていることがわかった (図 2(A))。また、感染 48 時間後には、*Acanthamoeba* sp. はほぼ死滅しているのに対し、*Hartmannella* sp. ではシスト化が進んだ像が観察された。宿主であるアメーバの種類における増殖能の違いについて、宿主アメーバの存在下で *L. pneumophila* の遺伝子発現の変動を RNA-seq により網羅的に解析した (図 2(B))。その結果、*Acanthamoeba* sp. の存在下、および *Hartmannella* sp. の存在下ではそれぞれ 1800 以上の遺伝子で発現量の有意な上昇または減少が認められたが (図 2B-a, b) 宿主アメーバの違いによる顕著な差は認められなかった (図 2B-c)。従って、感染実験で確認された宿主アメーバ内の増殖率の差は *L. pneumophila* のアメーバ内侵入後に発現する遺伝子の違いに由来する可能性が示唆された。



(3) 冷却塔に定着している *L. pneumophila* の遺伝的特徴

冷却塔に定着する *L. pneumophila* は、大きく 3 つのグループ clonal complex (CC) (CC1, CC2, CC3) に分類される。CC の代表的な ST については、それぞれ CC1 (105/161, 65.2%) は ST1、CC2 (22 /161, 13.7%) は ST154、CC3 (20/161, 12.4%) は ST2603 であった。CC2 は他の二つの CC とは大きく離れており、*L. pneumophila* subsp. *fraseri* のゲノムと同一クラスターに存在した (図 3(A))。CC1 と CC3 にはそれぞれ 2 つずつサブクラスターが形成されており、サブクラスター内は極めて近縁であったが、サブクラスター間では同一 CC (ST) 内でもコア SNP 数が数百を超えており多様性が見られた (図 3(A))。近縁であった株同士は分離年・施設に関わらず近縁であった為、冷却塔では特定の遺伝系統が広く伝播している可能性が示唆された。また、同一施設において経年的に分離された株がそれぞれ別のサブクラスターまたは別の CC に分類されることもあり、同一環境中に複数の遺伝系統の *L. pneumophila* が共存している可能性が示唆された。さらに、それぞれの CC に特徴的なプラスミドが内在していることを見出した。解析した 9 株全て、1 つ以上のプラスミドが存在しており、類似性のある 100kbp を超えるプラスミドが全株に 1 つずつ存在していた。それらのプラスミドは CC 系統を反映する傾向が確認された。CC1 の 3 株からは約 130kbp の配列が完全に一致するプラスミドが検出され、それは *L. pneumophila* Paris 株で報告された pLpp と 90% 以上の配列類似性を示した (図 3(B))。一方で、CC3 が保有するプラスミドは約 160 ~ 180kbp と CC1 よりも長大であり、データベース上に類似のプラスミドは登録されていなかったが、CC1 のプラスミドと接合伝達系など主要な遺伝子群で共通の遺伝子構造が確

認められた。また、細胞内寄生に重要な役割を果たすと考えられる二成分制御系 *IrpR / IskS* が保存されており、レジオネラの病原性や環境適応にプラスミドが寄与している可能性が考えられた。

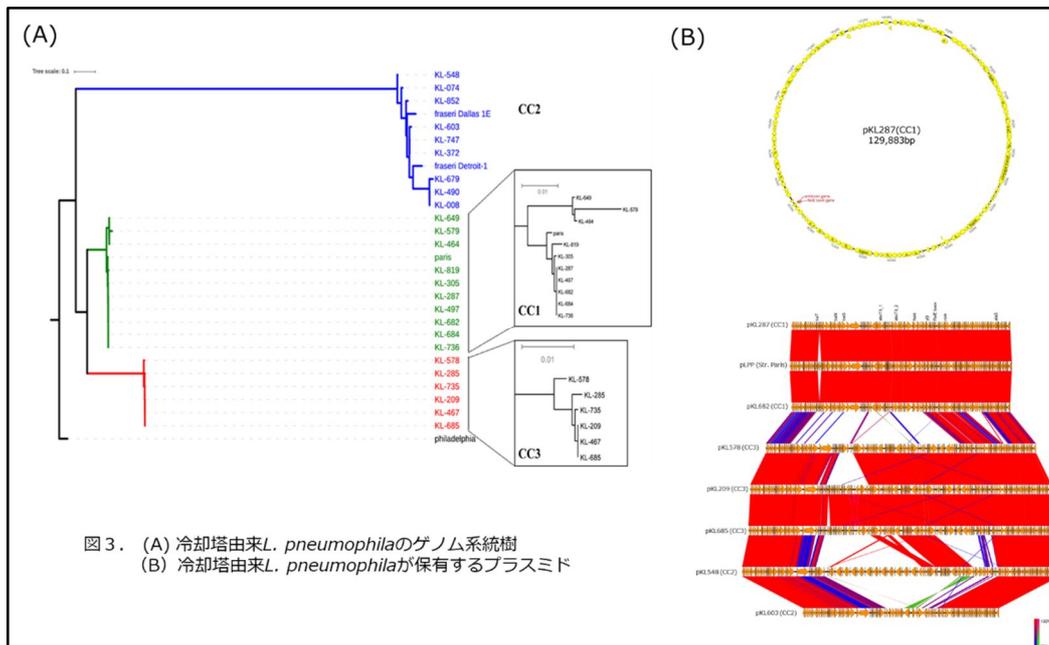


図3. (A) 冷却塔由来 *L. pneumophila* のゲノム系統樹
(B) 冷却塔由来 *L. pneumophila* が保有するプラスミド

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Komatsu Shoko, Tanaka Shinobu, Nakanishi Noriko	4. 巻 21
2. 論文標題 Prevalence and genetic distribution of Legionella spp. in public bath facilities in Kobe City, Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Water and Health	6. 最初と最後の頁 1727 ~ 1734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2166/wh.2023.247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Komatsu Shoko, Tanaka Shinobu, Nakanishi Noriko	4. 巻 76
2. 論文標題 Evaluation of Legionella pneumophila SGUT Serotypes Isolated from Bath Water Using a Multiplex-PCR Serotyping Assay	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 77 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2022.397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 藤永千波、小松頌子、田中忍、八木正博、中西典子、大久保祥嗣、向井健悟	4. 巻 51
2. 論文標題 市内浴場施設における理化学検査とレジオネラ属菌検出との関連性について	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 神戸市健康科学研究所報	6. 最初と最後の頁 58-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakanishi Noriko, Komatsu Shoko, Tanaka Shinobu, Mukai Kengo, Nomoto Ryohei	4. 巻 11
2. 論文標題 Investigation of a Legionella pneumophila Outbreak at a Bath Facility in Japan Using Whole-Genome Sequencing of Isolates from Clinical and Environmental Samples	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 28 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms11010028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 小松頌子、中西典子、岩本朋忠	4. 巻 第 49 巻
2. 論文標題 市内温泉施設における緊急事態宣言後のレジオネラ属菌の検出状況と遺伝子型の推移	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 神戸市健康科学研究所報	6. 最初と最後の頁 39-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 田中忍、中西典子、岩本朋忠	4. 巻 第48巻
2. 論文標題 人工環境水におけるアメーバ類の生息実態とレジオネラ属菌の関連性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 神戸市環境保健研究所 所報	6. 最初と最後の頁 51-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 小松頌子、田中忍、中西典子
2. 発表標題 公衆浴場から分離されたレジオネラ属菌の生態学的・遺伝的特徴 (2016-2021)
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第50回年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shoko Komatsu, Shinobu Tanaka, Ryohei Nomoto, Noriko Nakanishi
2. 発表標題 The genetic characterization of <i>L. pneumophila</i> SG1 isolates from bath water in Kobe City, Japan.
3. 学会等名 The 10th International Conference on Legionella. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Noriko Nakanishi, Shoko Komatsu, Shinobu Tanaka, Ryohei Nomoto.
2. 発表標題 Whole-Genome analysis of <i>L. pneumophila</i> strains causing outbreak at bath facility in Kobe, Japan.
3. 学会等名 The 10th International Conference on Legionella. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taguri, T., Cai, G., Nakanishi, N., Hiratsuka, T., Inoue, H., Shimoda, T., Shinmichi K., Kura F. and Amemura-Maekawa, J
2. 発表標題 Bacterial counts by flow cytometry can determine presence/absence of Legionella in bath water.
3. 学会等名 The 10th International Conference on Legionella. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kayo Osawa, Noriko Nakanishi, Mari Kusuki, Katsumi Shigemura, Takayuki Miyara:
2. 発表標題 Acquisition of antimicrobial-resistant variants in repeated infections caused by <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3. 学会等名 第94回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中忍、中西典子、岩本朋忠
2. 発表標題 人工環境水から検出されたアメーバ類とレジオネラ属菌との関連性
3. 学会等名 令和元年度(第46回) 地方衛生研究所全国協議会近畿支部 細菌部会研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko Nakanishi
2. 発表標題 Monitoring and Distribution of Legionella in artificially made water system in Kobe City, Japan
3. 学会等名 The 60th Anniversary of School of Public Health (SPH), Fujian Medical University (FJMU), A joint symposium on public health and environment in southeastern China and Ja (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西典子・野本竜平・田中忍・有川健太郎・岩本朋忠
2. 発表標題 冷却塔に定着するL. pneumophilaのゲノム分子疫学解析
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田栗利紹, 蔡 国喜, 加藤定男, 中西典子, 平塚貴大, 井上浩章, 縣 邦雄, 新道欣也, 鳥井 良太, 齋藤利明, 木村哲也, 小森正人, 小田康雅, 下田貴宗, 泉山 信司
2. 発表標題 フローサイトメトリー法等の非培養検査法を利用した入浴施設の衛生管理の推進方法
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第50回年次大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	野本 竜平 (Nomoto Ryohei) (60642238)	神戸市健康科学研究所・その他部局等・副部長 (84505)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------