

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510038

研究課題名(和文) レジオネラ症患者由来と環境由来SG1株間の疫学的及び病原性相違に関する研究

研究課題名(英文) Epidemiological and Pathogenic Features of Legionella pneumophila Serogroup 1
Clinical and Environmental Isolates in Japan

研究代表者

大野 章 (OHNO, Akira)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：40223903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：レジオネラ肺炎の主原因 Legionella pneumophila SG1 について疫学調査を実施した。その結果、臨床株と環境株では疫学的特徴が相違し、特に本邦に特徴的な様相が、臨床分離株で最も優勢な SG1 Benidorm 系 subgroup が、冷却塔水分離株にはなく、温泉水分離株では優勢なことで、このことが本邦の主な市中レジオネラ感染が温泉施設で生じる事実と関連すると結論づけた。また菌株特異的因子 Lvh type IVA SS および 65kb pathogenic island (PI) の保有率が環境分離株、特に冷却塔水分離株で顕著に高く、さらに 65kb PI が塩素耐性に寄与することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated that the characteristics of Legionella pneumophila serogroup 1 (SG1), the major causative agent of Legionnaires' disease, was distinctly different between clinical isolates and environmental isolates despite of the same serogroup, and the environmental isolates carried frequently the strain-specific elements (the Lvh type IVA secretion system and the 65kb pathogenic island (PI)) not shared by a number of clinical isolates. Further we found that the 65kb PI had a role for chlorine tolerance. Finally, we concluded that the fact that the Benidorm type subgroups, most common in clinical isolates, were not found in cooling tower isolates but relatively predominant in hot spring isolates might relate to that legionella infection occurs mostly at spa facilities.

研究分野：微生物学

キーワード： Legionella pneumophila Serogroup 1 Subgroup Sequence type 臨床分離株 環境分離株 64kb pathogenic island 塩素耐性

1. 研究開始当初の背景

レジオネラ症(肺炎)の原因のほとんどは *L.pneumophila* 血清群 1 (SG1) である。SG1 は LPS 糖鎖構造に対するモノクローナル抗体型別により subgroup に細分される¹⁾。ヨーロッパレジオネラ症サーベイランスネットワーク (ELDSNet) データによれば、臨床分離 SG1 株は、MAb3/1 系 subgroup (MAb3/1 epitope を有する subgroup の病原性に関与すると考えられている²⁾) が多くを占める (http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/legionnaires-disease-europe-2014.pdf)。しかし人がレジオネラに感染する場である環境から分離される SG1 株には MAb3/1 に以外の subgroup も優勢に分布している。レジオネラ症発生予防に重要な情報であるが、本邦ではまだこのような疫学調査はなされてなかった。

2. 研究の目的

(1) 本邦においては、レジオネラ症発生の背景となる環境は、循環ろ過式温泉であり、景観水やシャワーヘッドなどからの感染が多いヨーロッパと異なる。そのため疫学的特徴もヨーロッパと相違すると推定される。本研究は、臨床分離株、温泉水分離株、冷却塔水分離株多数株を集め、本邦での *L.pneumophila* SG1 の特徴を明らかにする。

(2) *L.pneumophila* 間ではゲノム配列の 95% は共通する。しかし菌株特異的な転移性、獲得性の遺伝子が 5% 存在する³⁾。その中でも Lvh IVA secretion system (SS)、65kb pathogenic island (PI) は、自然環境中での生残に関係するとされる^{4) 5)}。集めた臨床分離株および環境株の全てを対象に、これら遺伝子の保有率を調べ、臨床分離株と環境株における SG1 の偏りの要因の一端を明らかにする。

(3) レジオネラ属菌の自然界の主要寄生宿主である *acanthamoeba* を用い、臨床分離株と環境分離株の疫学的特徴を代表する菌株を混合感染させ、アメーバ内でどのような挙動を示すか検討し、臨床分離株、環境分離株における SG1 の偏りが起こる要因を探る。

(4) 最近 65kb PI には、塩素耐性を付与する機能があると報告された⁶⁾。65kb PI 組込み株およびその isogenic 株を用い、塩素耐性を確認すると共に、臨床分離株、環境株の各疫学的代表株で 65kb PI 保有、非保有株の塩素耐性を調べる。そして現在本邦で義務付けられている塩素消毒に対する耐性度が、臨床分離株と環境株との間の SG1 subgroup の偏りにどのように影響しているかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

L.pneumophila SG1 臨床分離 50 菌株、温泉施設浴槽水分離 29 菌株、冷却塔水分離 34 菌株、トータル 113 菌株を対象とした。

(2) LPS 合成遺伝子オペロンの変異多型に基づいた PCR による SG1 subgrouping

Thürmer らは、モノクローナル抗体 subgrouping を genotype によって行う PCR 法を開発した⁷⁾。本研究は Thürmer ら方法に従い、遺伝子レベルでの SG1 の確認、MAb3/1 陽性株の確認、SG1 subgrouping をそれぞれ実施した。

(3) 塩基配列によるタイピング (SBT)

ELDSNet のプロトコールに従い、Sequence type (ST) を決定した。各 ST のクラスタリングは、eBURST ver. 3 のプログラムを用い、単一の配列部位変異をクローナルコンプレックス (CCs) の決定に使用した⁸⁾。

(4) Lvh type IV A SS、65kb PI の検出

Lvh type IVSS および 65kb PI の、各菌株における保有の有無を PCR により検出した^{4) 5)}。

(5) *Acanthamoeba castellanii*

ATCC30234 に対する混合菌株感染実験

L.pneumophila SG1 株間の環境での生残優位性の有無を調べるため、各グループ分離株の疫学的特徴を代表する菌株の混合菌液による *A.castellanii* ATCC30234 に対する感染実験を行った。使用した菌株リストを Table1 に示す。

Table1 Isolates and the respective features used in a competitive infection experiment

Source	Isolate No.	Subgroup	Sequence type	Clonal complex	MAb3/1	Lvh Type IVA SS	65-kb PI
Clinical isolates	TUM14226	Benidorm/France	ST1494	CC59	+	+	-
	TUM14237	Benidorm/France	ST1497	CC59	+	-	-
	TUM14256	Benidorm/France	ST384	CC23	+	+	-
	TUM14259	Benidorm/France	ST120	CC23	+	-	-
	JR32	Philadelphia 1	NT	NT	+	-	-
Hot spring isolates	IR32/ICE-Boxcan		NT	NT	+	-	+
	TUM13944	Benidorm	ST1758	CC23	+	+	-
	TUM13948	OLDA/Oxford	ST1151	CC1137	-	-	+
	TUM14296	Bellingham	ST1151	CC1137	-	+	-
	TUM14306	Benidorm/France	ST59	CC59	+	+	+
Cooling tower isolates	TUM14301	Bellingham	ST552	CC59	-	+	+
	TUM13947	OLDA/Oxford	ST1	CC1	-	+	+
	TUM14274	OLDA/Oxford	ST22	CC23	-	-	-
	TUM14277	OLDA/Oxford	ST1	CC1	-	+	-

BCYE α 培地にて発育したコロニーを数コロニー滅菌綿棒にて取り、アカンソアメーバ緩衝液 (AC buffer) 5ml に懸濁、マックファランド 5 にネフロメーターを用いて調整した。それぞれの代表株の混合菌液を作成するため、Table1 の組合わせに従い、各菌液 0.5ml を滅菌済みチューブに添加し、最終的に AC buffer にて 5ml に調整した。また各単独菌株の AC buffer 10 倍希釈液を、単独菌感染用として調整した。感染実験法は既報に従った⁹⁾。

6) 塩素耐性実験

5ml 滅菌済みチューブに滅菌水 4.95ml を加え、次亜塩素酸ナトリウムを目的の濃度になるように 50 μ L 添加した。BCYE α 培地で培養した数コロニーを滅菌綿棒でとり、滅菌生理食塩水に懸濁して MacFarland 0.5 に調整、1 x 10⁸ cfu/ml の接種用菌液を調整した。接種用菌液の 5 μ l を、所定の遊離塩素濃度に調整した塩素含有水中に滴下し、ストップウォッチで所定の秒数をカウントし、25%チオ硫酸ナトリウム液 10 μ l を滴下し反応を停止した。Plate 法により菌数を測定した(n=3)。

4. 研究成果

(1) PCR による SG1 subgrouping

結果を Fig.2A,B,C に示した。

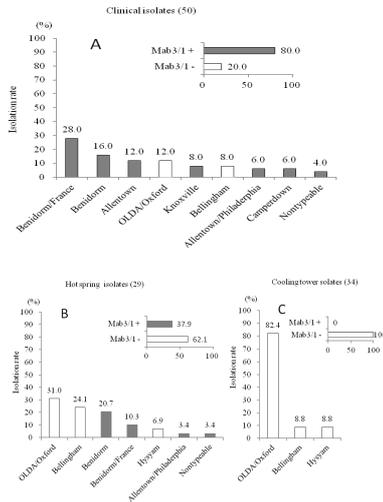


Fig.2 PCR based MAb subgrouping for the SG1 isolates from each source area

優勢な臨床分離株 subgroup は Benidorm/France (14/50 isolates)、Benidorm (8/50 isolates) で全体の 44.0% を占めた。全体の 80% は Mab3/1 陽性であった (Fig.2A)。

温泉水分離株 29 菌株においては OLDA/Oxford、Benidorm 系 (Benidorm、Benidorm/France) がそれぞれ 9/29; 31.0% づつで優勢であった。全体の 62.1% (18/29 isolates) は Mab3/1 陰性であった (Fig.2B)。

冷却塔水分離株 34 菌株については、OLDA/Oxford が全体の 82.4% (28/34 isolates) を占め、極めて優位であった。すべての菌株は Mab3/1 陰性であった (Fig.2C)。

(2) SBT clonal complex(CC)

結果を Fig.3 ABC に示した。

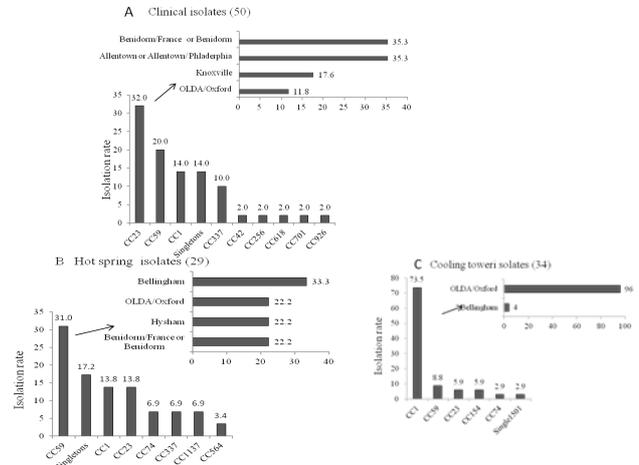


Fig.3 PCR-based SG1 subgrouping and clonal complex group by SBT in the SG1 isolates from each source area

臨床分離株において、CC23 が 32% と最も多く、これらには Benidorm 系、Allentown、Allentown/Philadelphia、Knoxville、および OLDA/Oxford が含まれた。CC23 に続いて、CC59 が 20%、CC1 が 14%、CC337 が 10% であった。温泉水分離株では CC59 が最も多く 31% を占め、Bellingham、OLDA/Oxford、Hysham、Benidorm 系が含まれた。冷却塔水分離株においては、CC1 が 25 菌株で全体の 73.5% を占めた。

(3) Lvh type IVA SS、65kb PI の保有率結果を Fig.4 に示した。

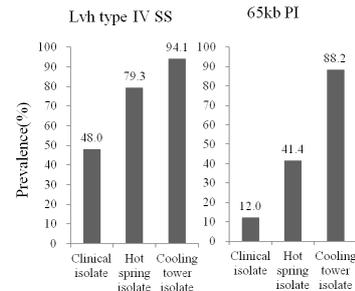


Fig. 4 Prevalence of strain-specific Lvh type IV SS and 65kb PI in SG1 isolates from each sources

Lvh type IV SS、65kb PI 保有率は、環境分離株で高く、特に冷却塔水分離株では両者共に高率であった。Fig.5 に SG1 subgroup ごとの Lvh type IVA SS、65kb PI 保有率を示した。

Lvh type IVA SS、65kb PI の両者とも、OLDA/Oxford における保有率が高く、それぞれ半数以上を占めた。また全体として Mab3/1 陰性株が、両者ともほとんどを占めた。また 65kb PI については、OLDA/Oxford でも、冷却塔水分離株でより高い保有率が認められた。

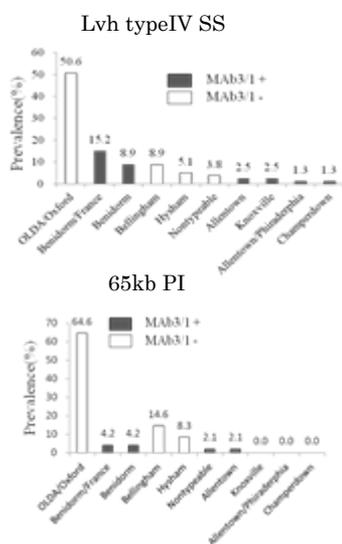


Fig. 5 Prevalence of Lvh type IVA SS and 65kb PI in SG1 subgroups

Fig.6にSG1 CCタイプごとのLvh type IVA SS、65kb PIの遺伝子保有頻度を示した。Lvh type IVA SS、65kb PI共に、保有株の多くはCC1に分布した。CC59、CC23がそれに続いた。

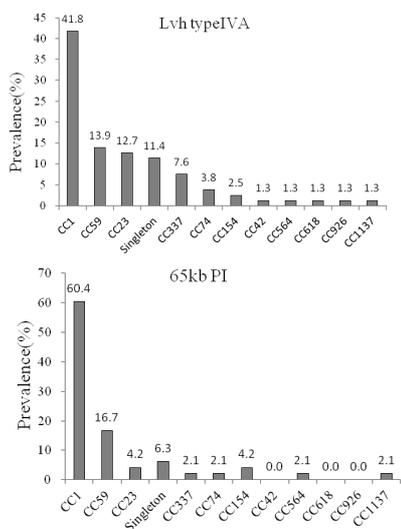


Fig. 6 Prevalence of Lvh type IVA SS and 65kb PI in clonal complex type by SBT

(4) *Acanthamoeba castellanii* ATCC30234 に対する拮抗感染

結果を Fig.7 に示した。

臨床分離株では CC23/Lvh type IVA SS 陽性/65kb PI 陰性の TUM14256 株がアメーバ内で優勢に増殖し、24 時間において特に優勢となった。温泉水分離株において CC59/Bellingham / Lvh type IVA SS 陽性/65kb PI 陽性 TUM14306 が 24 時間で著しく優勢となった。冷却塔水分離株では 3 時間で、OLDA/Oxford/CC1/Lvh type IVA SS 陽性/65kb PI 陰性の TUM14277 が優勢傾向にあったが、24 時間では OLDA/Oxford

/CC1/Lvh type IVA SS 陽性/65kb PI 陽性の TUM13947 が優勢となった。

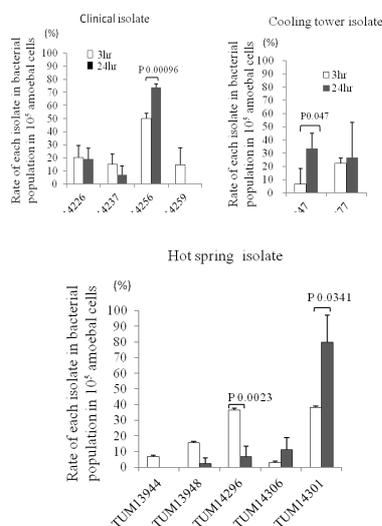


Fig.7 Competitive infection experiment of each source in *A. castellanii* ATCC30234

臨床分離株、温泉水分離株、冷却塔水分離株中、最も優勢あるいは優勢傾向を示した TUM 14256 株、TUM14306 株、TUM13947 株による混合拮抗感染の結果を Fig 8.に示した。

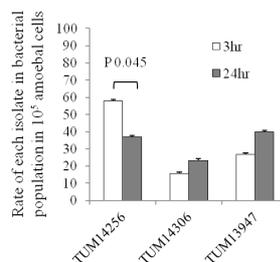


Fig.8 Competitive infection experiment among superior isolates from each source in *A. castellanii* ATCC30234

Otime の感染後 3 時間では臨床分離 TUM 14256 が優勢に増殖する傾向にあったが、24 時間では退行し、環境分離株、特に冷却塔水分離 TUM13947 の増殖が優勢傾向を示した。

(5) 塩素耐性実験

環境分離株に 65kb PI 保有率が高い結果と、65kb PI に塩素耐性性能があるとの最近の報告⁶⁾との関連を検討した。あらかじめ 65kb PI 非保有(*L.pneumophila* JR32) 保有 isogenic 株(*L.pneumophila* JR32 ICE-Box)を用いた予備実験から得られた遊離塩素濃度 0.03125mg/L/ 90 秒暴露の条件を用い、アメーバ拮抗実験に使用した菌株を対象に、塩素耐性実験を行った。

Fig.9 に結果を示した。

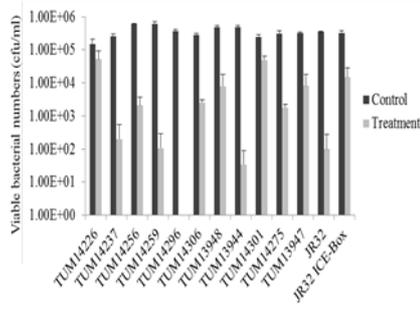


Fig.9 Choline tolerance ability of each representative isolate used in the competitive experiment for acanthamoeba

さらにJR32 および JR32 ICE-Box の結果を基に、treatment 値の対数値を control 値の対数値で除した値から、それが 0.5 を越えた場合を塩素に耐性あるいは耐性傾向があると判定し、その結果を Fig.10 に示した。

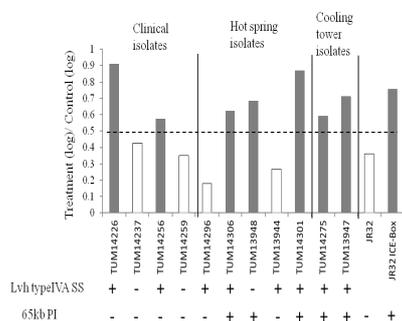


Fig.10 Choline tolerance ability (Treatment(log) / Control(log))

結果から環境分離株で塩素耐性あるいは耐性傾向を示した株はすべて 65kb PI 保有株であった。しかし塩素耐性を示した臨床分離株は 65kb PI 陰性であった。

ヨーロッパにおいては臨床分離株で最も優勢な SG subgroup は Allentown/France であるが(ELDSNet データベース)、本邦では Benidorm 系が最も優勢でヨーロッパとは異なる様相を示した。一方環境分離株は臨床分離株とは異なり、OLDA/Oxford がヨーロッパと同様優勢で、特に冷却塔水分離株では顕著であった。しかし温泉由来株では subgroup は比較的多彩で、臨床分離株で最も優勢な Benidorm 系も、優勢なグループとして分布していた。冷却塔水分離株では、Benidorm 系は存在しなかった。

SBT 分類からは、ヨーロッパと本邦に共通して臨床で優勢な CC は CC23 と CC1 であった。しかし本邦では、CC23 とヨーロッパで劣勢な CC59 と合わせて半数を越えた。しかも CC23 と CC59 の半数以上が Benidorm 系であることから、SBT 分類においてもヨーロッパと異なる本邦の特徴が浮かび上がった。一方最も優勢な環境分離株はヨーロッパ

で CC1 であり、本邦でも冷却塔水分離株では 73.5% が CC1 と突出し、ヨーロッパと類似した。しかし温泉水分離株では異なり、最も優勢な CC は 59 であった。

冷却塔水分離株には検出されず、温泉水分離株で比較的優勢であった CC59/Benidorm 系が、また本邦臨床分離株でも優勢な CC/subgroup であるとの調査結果は、本邦におけるレジオネラ感染の主な場が温泉であることとの関連を強く示唆した。ヨーロッパでのレジオネラ感染は景観水などの人工水環境であり、本邦の冷却塔水環境と同様、河川水など淡水を水源とする。それに比べ本邦温泉は火山性由来が多く水質も多彩である。CC23 や CC59、特にその半数以上を占める Benidorm 系 subgroup は、そのような環境に生残しやすいのか、あるいは LPS 病原性エピトープ²⁾とされる MAb3/1 を有することも合わせ、本邦におけるレジオネラ感染が温泉施設に集中する要因となっていると考えられる。

今回 65kb PI 非保有、保有の isogenic strains を用い、65kb PI に塩素耐性能が存在することを確認した上で 65kb PI 保有株に塩素耐性能が見られるか検討し、65kb PI 保有株に塩素耐性あるいは塩素耐性傾向を認められた。本研究において、65kb PI 保有株は、臨床分離株で非常に低く(12.0%)、環境分離株で高い結果だった。しかし環境分離株でも、温泉水分離株に比べ、保有率は冷却塔水分離株で顕著であった。一般的に水道水が使用される冷却塔水では塩素消毒効果は十分保たれる。しかし本邦温泉では、鉄分の多い泉質や硫化物の多い泉質が少なからず存在し、これらにおいては塩素消毒効果は大きく低下する。温泉水分離株に 65kb PI 保有株が比較的少なかったことは、塩素消毒していても、これら泉質で 65kb PI による塩素選択生残性が機能しにくいことが理由かもしれない。一方臨床分離株で 65kb PI は陰性であったが、塩素耐性を示した 2 株の Benidorm 系の存在は、65kb PI 以外に unknown な塩素耐性因子が存在し、Benidorm 系が優勢な要因となっていることをまた示唆する。

アカンソアメーバ拮抗感染実験では、少なくとも菌株特異的な Lvh type IVA SS、65kb PI の存在が、塩素消毒能とも絡めて、アメーバ内での増殖において重要な役割を果たしていることが、本研究から示唆された。

<引用文献>

- 1) Joly JR, et al. Development of a standardized subgrouping scheme for Legionella pneumophila serogroup 1 using monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 1986, 23:768-771
- 2) Gosselin F, et al. Impact of the virulence-associated MAb3/1 epitope on the physicochemical surface properties of Legionella pneumophila sg1: An issue to

- explain infection potential? Colloids Surf. B Biointerfaces. 2011, 82:283-290
- 3) Gomez-Valero L, Buchrieser C .Genome dynamics in Legionella: the basis of versatility and adaptation to intracellular replication. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013, 3(6). pii: a009993
 - 4) Bandyopadhyay P, et al.Environmental mimics and the Lvh type IVA secretion system contribute to virulence-related phenotypes of Legionella pneumophila. Infect Immun. 2007,75:723-735
 - 5) Brassinga AK, et al. A 65-kilobase pathogenicity island is unique to Philadelphia-1 strains of Legionella pneumophila. J Bacteriol. 2003,185:4630-4637
 - 6) Flynn KJ, Swanson MS. Integrative conjugative element ICE-Box confers oxidative stress resistance to Legionella pneumophila in vitro and in macrophages.MBio.2014,5:e01091-14
 - 7) Thürmer A, et al. PCR-based 'serotyping' of Legionella pneumophila. J Med Microbiol 2009;58:588-595
 - 8) Feil EJ, et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J Bacteriol. 2004, 186:1518-1530
 - 9) Ohno A, et al.Temperature-dependent parasitic relationship between Legionella pneumophila and a free-living amoeba (Acanthamoeba castellanii). Appl Environ Microbiol. 2008, 74:4585-4588

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

大野 章, 加藤尚之, 嵯峨知生, 青木弘太郎, 吉住あゆみ, 舘田一博. *Legionella pneumophila* serogroup1 温泉分離株と冷却塔分離株、および臨床分離株の疫学的特徴と *Acanthamoeba* 侵入増殖能の比較. 日本温泉科学会第 67 回大会. 三朝町英国民宿「プランナールみささ」(鳥取県東伯郡三朝町). 2014. 9. 5

Akira OHNO, Naoyuki KATO, Tomoo SAGA, Kazuhiro TATEDA. Epidemiological and Pathogenic Features of *Legionella pneumophila* SG1 Clinical and

Environmental Isolates. The 8th International Conference LEGIONELLA. Melbourne, Victoria, Australia, 2013. 10. 29

大野 章, 加藤尚之, 嵯峨知生, 山口惠三, 舘田一博. 循環温泉水、冷却塔水および臨床由来の各 *Legionella pneumophila* SG1 の subgroup および病原性の相違. 第 61 回日本感染症学会東日本地方学術集会合同学会. ホテル日航東京 (東京都港区). 2012. 10. 11

大野 章, 加藤尚之, 嵯峨知生, 舘田一博. 温泉、冷却塔、臨床由来の各 *Legionella pneumophila* SG1 の subtype および病原性の相違. 第 65 回日本温泉科学会大会. 第一瀧本館 (北海道登別市). 2012. 9. 27

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大野 章 (OHNO, Akira)
東邦大学・医学部・講師
研究者番号 : 40223903

(2) 研究分担者

加藤 尚之 (KATO, Naoyuki)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号 : 50104154