

原 著

本邦における臨床由来および環境（温泉水，冷却塔水）由来  
*Legionella pneumophila* SG1 株の疫学  
および病原性因子の特徴

大野 章<sup>1)\*</sup>, 加藤尚之<sup>1)</sup>

(平成 28 年 11 月 11 日受付, 平成 29 年 1 月 11 日受理)

Epidemiological and Pathogenic Features of  
*Legionella pneumophila* Serogroup 1 from  
Clinical and Environmental Isolates in Japan

Akira OHNO<sup>1)\*</sup> and Naoyuki KATO<sup>1)</sup>

Abstract

Wide-ranging *Legionella pneumophila* serogroup 1 (SG1) subgroups and clonal complex (CC) types were observed in clinical isolates (CIs), hot spring isolates (HSIs) and cooling tower isolates (CTIs) by PCR-based monoclonal antibody (MAb) subgrouping and sequence-based CC typing. Most subgroups of CIs possessed the virulence-related MAb3/1 epitope on lipopolysaccharide. The MAb3/1-positive Benidorm/France or Benidorm with CC23 or CC59 were dominant among CIs, which are also observed in relatively large numbers in HSIs. CTIs were dominated by the MAb3/1-negative OLDA/Oxford with CC1 subgroup. Subsequently, we assessed the presence of the strain-specific Lvh type IV A secretion system (SS) [A] and the 65-kb pathogenic island (PI) [B] by PCR (polymerase chain reaction). The prevalence rates of both genes were as follows: CIs: [A]: 48.0% and [B]: 12.0%, HSIs: [A]: 79.3% and [B]: 41.4%, CTIs: [A]: 94.1% and [B]: 88.2%. These results demonstrated that the features of *Legionella* infection in Japan differ somewhat from that of the world. Particularly, the results suggested that HSIs exhibited properties of both CIs and CTIs, which may be related to the observation that Legionnaires' disease in Japan has frequently occurred in hot spring facilities. We also performed a competitive infection experiment for *Acanthamoeba castellanii* using representative isolates with a common feature of each isolate's group. The results of a competitive infection experiment also suggested that the MAb3/1 epitope of *L. pneumophila* SG1 may contribute to an early step of infection and that both the Lvh type IV A SS and the 65-kb PI may affect their survival in the host cell. Chlorine resistance ability on the 65-kb PI was confirmed and therefore the significantly

<sup>1)</sup>東邦大学医学部医学科 〒143-8540 東京都大田区大森西 5-21-16. <sup>1)</sup>Faculty of Medicine, Toho University, 5-21-16 Omori-Nishi, Ota-Ku, Tokyo 143-8540 Japan. \*Corresponding author: E-mail akira@med.toho-u.ac.jp, TEL 03-3762-4151 ext.2396-7, FAX 03-5493-5415.

high positive rate of the 65-kb PI in CTIs may be due to chlorination of cooling tower water. However, the positive rate in HSIs was relatively low in comparison to CTIs. It may be depending on some spring qualities that chlorination are not effective.

Key words : *Legionella pneumophila* serogroup 1, Monoclonal typing subgroup, Lvh type IV secretion system, 65-kb pathogenic island, *Acanthamoeba*, Chlorine resistance

## 要 旨

本邦臨床分離株 (CIs), および温泉水分離株 (HSIs), 冷却塔水分離株 (CTIs) における *Legionella pneumophila* 血清群 1 (SG1) について, PCR 法によるモノクローナル抗体 (MAb) 型別 subgroup および塩基配列型別法による clonal complex type (CC type) を調べた. CIs は広範囲の subgroup や CC type を示した. 最も優勢なものは病原性 Lipopolysaccharide (LPS) エピトープ MAb3/1 陽性 Benidorm 系, CC23 および CC59 であった. CTIs では, すべて MAb3/1 陰性で, そのほとんどが OLDA/Oxford subgroup CCI であった. HSIs は, CIs および CTIs の中間の様相を呈し, Benidorm 系も優勢で, 本邦でのレジオネラ感染が温泉で生じやすい背景を反映している. PCR (polymerase chain reaction) 法により調べた菌株特異的遺伝子 Lvh type IV secretion system (SS) [A] および 65-kb pathogenic island (PI) [B] の保有率は, CIs : [A] : 48.0% and [B] : 12.0%, HSIs : [A] : 79.3% and [B] : 41.4%, CTIs : [A] : 94.1% and [B] : 88.2% であった. アメーバ拮抗感染実験では, 感染初期に MAb3/1 陽性株が優勢に増殖し, 本エピトープの病原性関与を示唆した. 感染後半では Lvh type IV secretion system および 65-kb PI の存在が重要である成績を得た. また 65-kb PI には塩素耐性能が賦与されており, CIs のほとんどが 65-kb PI 保有株である要因と推定された. 一方 HSIs では CIs に比べ保有率は低く, 塩素無効の泉質が少なくないことを反映したものと考えられた.

キーワード : レジオネラ・ニューモフィラ血清群 1, モノクローナル抗体型別亜血清群, Lvh type IV 分泌システム, 65-kb 病原性アイランド, アカンソアメーバ, 塩素耐性

## 1. はじめに

レジオネラ属菌は, 人工環境水, 温水システムに生息する原生動物, 主に自由生活アメーバに対する通性寄生菌である. ヒトはそのような水システムにおいて, アメーバ内で増殖派生したレジオネラ細胞を含むエアロゾルを吸入して感染する. 今日まで, レジオネラ属には 62 菌種 3 亜種が含まれる ([http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial\\_nomenclature\\_info.php?genus=Legionella](http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature_info.php?genus=Legionella)). *Legionella pneumophila* は, レジオネラ症の主要原因菌種で, 環境中に最もよく見られるレジオネラ属菌種でもある. *L. pneumophila* は 15 以上の血清型を有し, レジオネラ症感染のほとんどは血清型 1 (SG1) である. しかしながら環境中では SG1 は比較的少数である (Yu VL *et al*, 2002). *L. pneumophila* SG1 は, また American Type Culture Collection, ATCC 株からの国際パネルモノクローナル抗体 6 種とモノクローナル 3 で構成されたドレスデンモノクローナル抗体パネルを用いた国際サブグループピング体系に従い, 多くのモノクローナルサブグループに分けることが可能である. 現在 11 のサブグループに分けられている (Joly JR' *et al* 1986 ; Helbig JH *et al*, 2002). 興味深いことに, ほとんどの臨床分離株はモノクローナル抗体 3/1 (MAb3/1) 陽性のサブグループに属するが (Amemura-Maekawa J *et al*, 2010), 環境分離株の多くは, MAb3/1 陰性である (Amemura-Maekawa J, *et al*, 2012). MAb3/1 反応性エピトープは菌表層構造 Lipopolysaccharide (LPS) O 多糖にある 8-O-アセチル基であり, *L. pneumophila* SG1 の病原性に関係するとされる (Zahringer U, *et al*, 1995 ; Zou CH *et al*, 1999). しかしながら, 8-O-アセチル基が *L. pneumophila* SG1 の病原性に寄与しているか否かはまだ論争段階のままである (Luck PC *et al* 2001 ; Gosselin F *et al*, 2011 ;

Seeger EM *et al*, 2010). さらに, 最近の *L. pneumophila* 8 菌株を用いた比較ゲノム研究では, 3000 遺伝子以上で構成されるゲノムの約 300 遺伝子が, 菌株特異的であることを明らかにし, *L. pneumophila* においては, 菌株間の遺伝的多様性が大きいことを示した (Laura G・Carmen B 2013). 菌株特異的遺伝子はほとんどが推定機能タンパクで, 水平伝播された真核生物様タンパクを含み, 宿主タンパクに似せた病原因子として, あるいは様々な環境ストレスへの本菌種の適応に関与する (D'Auria G *et al*, 2010).

これらのことを合わせて考えると, *L. pneumophila* は MAb3/1 陽性株と, MAb3/1 陰性株の間で, 同じ血清型であるにも関わらず, 環境中において異なる能力を有することが示唆される. 本研究では, 菌株特異的因子として知られ, 自然環境条件下で生残するために重要な関与が推定されている Lvh type IV A 分泌システム (SS) および 65-kb 病原性アイランド (PI) に着目した. Lvh type IV ASS は, *L. pneumophila* の環境中での生息場所に類似した水環境条件において, *L. pneumophila* の病原性に関連する表現を伴うことが報告されている (Bandyopadhyay P *et al*, 2007). 65-kb PI は栄養枯渇条件下で見られる成熟細胞内形態 (MIF) と呼ばれるシスト様形態の形成に関与する MagA, 炭素貯蔵調節因子 CsrA, ペプチドメチオニン硫化物調節因子 MsrA などを含む, 約 70 種のタンパクをコードしている (Brassinga AK *et al*, 2003). そこで, MAb3/1-陽性 SG1 subgroup 株, MAb3/1-陰性 SG1 subgroup 株の自然環境下における生残能力に, Lvh type IV A SS および 65-kb PI の保持が影響するか否かに興味を持った. また最近では 65-kb PI 上には塩素耐性因子が賦与されているとの報告もなされ (Flynn KJ・Swanson MS, 2014), 塩素消毒が義務化されている本邦の循環温泉施設温泉水や冷却塔水での本菌の生残との関連に興味をもたれる. 本研究において, 我々は日本全国より集めた臨床分離株 50 菌株, 温泉分離株 29 菌株, 冷却塔分離株 34 菌株を対象に, モノクロナール抗体 subgrouping を PCR (polymerase chain reaction) 法により実施し, さらに Lvh type IV A SS および 65-kb PI の保有率を PCR (法により調べ, 加えて *Acanthamoeba* に対する病原性や, 塩素耐性の有無を検討し, 本邦における臨床由来および環境 (温泉水, 冷却塔水) 由来 *L. pneumophila* SG1 株の疫学および病原性因子の特徴を明らかにすることを試みた.

## 2. 材料と方法

### 2.1 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. 臨床株は全国レジオネラ感染を疑われる患者の喀痰あるいは気管洗浄液より分離され, 喀痰由来が 46 菌株, 気管洗浄液由来が 4 菌株である. 環境分離株は, 全国の多くの施設から分離され, アクアス株式会社筑波総合研究所 (茨城県つくば市) より分与を受けた. 温泉由来株のうちの 4 菌株は著者らが, 調査の過程で分離したものである. これら菌株は, 15% グリセロール加 LB ブロス中に懸濁し, 使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した. 使用時には炭研 BCYE $\alpha$  寒天生培地にて  $35^{\circ}\text{C}$ , 湿潤下 4 日間培養した. 血清型は, デンカ生研のスライドラテックス凝集キットを用いて決定した (レジオネラ凝集反应用抗原「生研」) (デンカ生研(株), 東京).

### 2.2 LPS 合成遺伝子オペロンの変異多型に基づいた PCR による monoclonal subgrouping

Thürmer らは, モノクロナール抗体 subgrouping を genotype によって行う PCR 法を開発した (Thürmer A *et al*, 2009). 本研究は Thürmer らの方法に従い, モノクロナール抗体反応性に関連する *L. pneumophila* SG1 の LPS 合成クラスター領域からデザインされた SG1 および SG1 サブグ

ループ特異的な以下のプライマーセットを用いた. 1) ORF9 および ORF10; すべての SG1 に共通の SG1 特異的領域, 2) Lag-1 all; MAb3/1 陽性の SG1 株に特異的な領域 (LPS O 多糖 O アセチル化を担う O-acetyltransferase をコードする Lag-1 遺伝子領域内), 3) Lag-1 Philadelphia, Lag-1 Knoxville, Lag-1 Allentown; Lag-1 遺伝子領域内に見られる SG1 subgroup に特異的なミスマッチ変異領域, 4) ORF6-8 (Benidorm/Bellingham), ORF7-9 (Knoxville); SG1 subgroup 間で有無が分かれる LPS 合成クラスター内に存在する 2 か所の遺伝子間領域.

これらのプライマーセットを用いた PCR 増幅産物のパターンにより, 遺伝子レベルでの SG1 の確認, MAb3/1 陽性株の確認, SG1 subgrouping をそれぞれ確定した. 各プライマー配列を Table 1 に示した.

PCR 条件は, 95°C 5 min → 95°C 30 sec-53-60°C 30 sec (プライマーにより温度は相違) - 72°C 1 min; 25 cycles → 72°C 7 min. アニーリング温度は Lag-all: 53°C, Lag-1 Allentown: 55°C, ORF9/ORF10/ORF6-8/ORF7-9: 55°C, Lag-1 Philadelphia/Lag-1 Knoxville: 60°C

### 2.3 塩基配列型別法による Clonal Complex (CC) typing

*L. pneumophila* ゲノムのハウスキーピング 7 遺伝子 (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, and

Table 1 Primer sets used for PCR-based subgrouping and the Lvh type IV A SS gene and the 65-kb PI in *L. pneumophila*

Purpose	Region (primer name)	Sequence(5' → 3')	Ampricon size(bp)
PCR-based subgrouping	<i>lag-1 all</i> For	ATGTAYAATAAACTCACAAAC	1065
	<i>lag-1 all</i> Rev	ATAAGCTAACTTRTTTGATG-	
	<i>lag-1 Philadelphia</i> For	AGTGAAAGCGGATTTGGCA	725
	<i>lag-1 Philadelphia</i> Rev	TTAGCCACTCGGAACTACG	
	<i>lag-1 Knoxville</i> For	AGTATGGGTGGATTTGGT	725
	<i>lag-1 Knoxville</i> Rev	TCATCCACTCACGAACCACTG	
	<i>lag-1 Allentown</i> For	AGTGGAGGCAGAGTTGGCA	725
	<i>lag-1 Allentown</i> Rev	TTAGCCACTCGGAACTACG	
	ORF9 For	CAGGATTACCGCTCATTATTG	561
	ORF9 Rev	GTAATTCCCAGCCATTACCAGATC	
	ORF11 For	GCATAGATCATCACGCTGCAG	280
	ORF11 Rev	GGATGGGGGCGATAAAGAATAAC	
	ORF 6 -ORF 8* For	GATACTAACAGCCAAGGTG	979
	ORF 6 -ORF 8 Rev	TCCAACCCAAGGAATTCCTG	
ORF 7 -ORF 9** For	CTAGATCACATTTCGTATCGTC	1010	
ORF 7 -ORF 9 Rev	GTTGACGAGATTGTATCTC		
LvH Type IV A secretion system and 65-kb pathogenic island	Lvh <i>prp A</i> For	GTTTAAATCCCCAGCAAGC	259
	Lvh <i>prp A</i> Rev	AATATCCCTACTCATCCTCG	
	Lvh <i>lvh B3/B4</i> For	GGCTAGGAGGTTCTTGTTG	1007
	Lvh <i>lvh B3/B4</i> Rev	ATTGGCCGAGATGTCCTT	
	Lvh <i>lvh B8/B9</i> For	CCTCTACGCATTACAACGCC	294
	Lvh <i>lvh B8/B9</i> Rev	GTGGTGGTAAAGGGGAATGCC	
	65-kbPI <i>mag A</i> For	CTCTATCGCTAACGCACAAGG	469
	65-kbPI <i>mag A</i> Rev	CGTTGAAGTAGTTAGTGAAAG	
65-kbPI <i>trad</i> For	GCTTATCATCACTTGCCCTTTA	633	
65-kbPI <i>trad</i> Rev	GCAGAGATACACCACCAATCCGA		

\*Intergenic region between ORF 6 and ORF 8 (Subgroup Benidorm/Bellingham)

\*\*Intergenic region between ORF 7 and ORF 9 (Subgroup Knoxville)

*neuA* の allele をターゲットとし, ELDSNet のプロトコールに従い, Sequence type (ST) を決定した ([http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/legionnaires\\_disease/ELDSNet/Pages/index.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/legionnaires_disease/ELDSNet/Pages/index.aspx)). 各 ST のクラスタリングは, eBURSTver.3 のプログラムを用い, 単一の配列部位変異を CC type の決定に使用した (Feil EJ *et al*, 2004).

## 2.4 Lvh type IV A SS, 65-kb PI の検出

Lvh type IVSS および 65-kb PI の, 各菌株における保有の有無を PCR により検出した. PCR 条件は SG1subgrouping と同様であるが, アニーリング温度は以下の通りである. Lvh type IV A SS に対するプライマー *prpA* および *lvh* B3/B4, 65-kb PI. に対するプライマー MagA : 55°C, 65-kb PI. に対するプライマー *trad* : 62.1°C. 使用したプライマー配列を Table 1 に示した.

## 2.5 *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. Table 2 に使用した菌株の, No., Subgroup, CC type, Mab3/1 保有の有無, Lvh type IVA SS および 65-kb PI 保有の有無を示した.

BCYE $\alpha$  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, アカンソアマーバ緩衝液 (AC buffer) 5 ml に懸濁, ネフロメーターを用いて MacFarland 5 に菌濃度を調整した. それぞれの代表株の混合菌液を作成するため, Table 2 の組み合わせに従い, 各菌液 0.5 ml を滅菌済みチューブに添加し, 最終的に AC buffer にて 5 ml に調整した. また各単独菌株の AC buffer (4mM MgSO $_4$ , 0.4 M CaCl $_2$ , 0.1% sodium citrate, 0.05 M Fe (NH $_4$ ) $_2$  · 6H $_2$ O, 2.5 mM NaH $_2$ PO $_3$ , 2.5 mM K $_2$ HPO $_3$ ; pH 6.5) 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 (Ohno A *et al*, 2008).

## 2.6 塩素耐性実験

5 ml 滅菌済みチューブに滅菌水 4.95 ml 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  $\mu$ L 添加した. BCYE $\alpha$  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 に菌濃度を調整, 1  $\times$  10 $^8$  cfu/ml の接種用菌液を調整した. 接種用菌液の 5  $\mu$ l

Table 2 Three isolates and the respective features used in a competitive infection experiment

Source	Isolate No.	Subgroup	Clonal complex type	MA3/1	Lvh type IVA SS	65kb PI
Clinical isolates	TUM14226	Benidorm/France	CC59	+	+	-
	TUM14237	Benidorm/France	CC59	+	-	-
	TUM14256	Benidorm/France	CC23	+	+	-
	TUM14259	Benidorm/France	CC23	+	-	-
Hot spring isolates	TUM13944	Benidorm	CC23	+	+	-
	TUM13948	OLDA/Oxford	CC1137	-	-	+
	TUM14296	Bellingham	CC1137	-	+	-
	TUM14301	Bellingham	CC59	-	+	+
Cooling tower	TUM14306	Benidorm/France	CC59	+	+	+
	TUM13947	OLDA/Oxford	CC1	-	+	+
	TUM14277	OLDA/Oxford	CC1	-	+	-

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  $\mu$ l を滴下し反応を停止し, Plate 法により菌数を測定した.

### 3. 結 果

#### 3.1 SG1 subgrouping

PCR による SG1 subgrouping の結果を Fig. 1 に示した. 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.

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% ずつで優勢であった. 全体の 62.1% (18/29 isolates) は MAb3/1 陰性であった.

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.

#### 3.2 SBT CC typing

結果を Fig. 2 に示した. 臨床分離株において, CC23 が 32% と最も多く, これらには Allentown 系, Benidorm 系, Knoxville および OLDA/Oxford が含まれた. CC23 に続いて, CC59 20%, CC1 14%, CC337 10% であった. 温泉水分離株では CC59 が最も多く 31% を占め, Bellingham, Benidorm 系, OLDA/Oxford, Hysham, 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, そのほとんどが OLDA/Oxford であった.

#### 3.3 Lvh type IVA SS の保有率

結果を Fig. 3 に示した. Lvh type IVA SS の保有率は, 臨床分離株の 48.0% に比べ, 環境分離株, 特に冷却塔水分離株で高率であった (温泉水分離株 79.3%, 冷却塔水分離株 94.1%). Fig. 4 に SG1 subgroup および CC type ごとの保有率を示した. MAb subgroups では OLDA/Oxford における保有率が高く 50.6% であった. また全体として MAb3/1 陰性株が 64.6% を占めた. CC type では CC1 が最も高く 41.8% を占めた.

#### 3.4 65-kb PI の保有率

結果を Fig. 5 に示した. 65-kb PI の保有率は, Lvh type IV SS の保有率と同様, 臨床分離株に比べ環境水由来で保有率は高かったが, 65-kb PI においては冷却塔水分離株の保有率が他に比べ突出し高率であった (88.2%). 臨床分離株においては Lvh type IV SS よりも低く, 12.0% の低率であった, また温泉水分離株は環境水ではあっても, Lvh type IV SS に比べ低く, 41.4% と 50% を下回った.

Fig. 6 に SG1 subgroup および CC type ごとの保有率を示した. MAb subgroups では OLDA/Oxford における保有率が高く 64.6% であった. ただし OLDA/Oxford でも冷却塔水分離株における OLDA/Oxford の 65-kb PI 保有率は, 温泉水分離株に比べ約 2 倍高率であった. また全体として MAb3/1 陰性株が 87.5% を占めた. CC type では CC1 が最も高く 60.4% であった.

#### 3.5 *Acanthamoeba castellanii* ATCC30234 に対する拮抗感染

結果を Fig. 7 に示した.

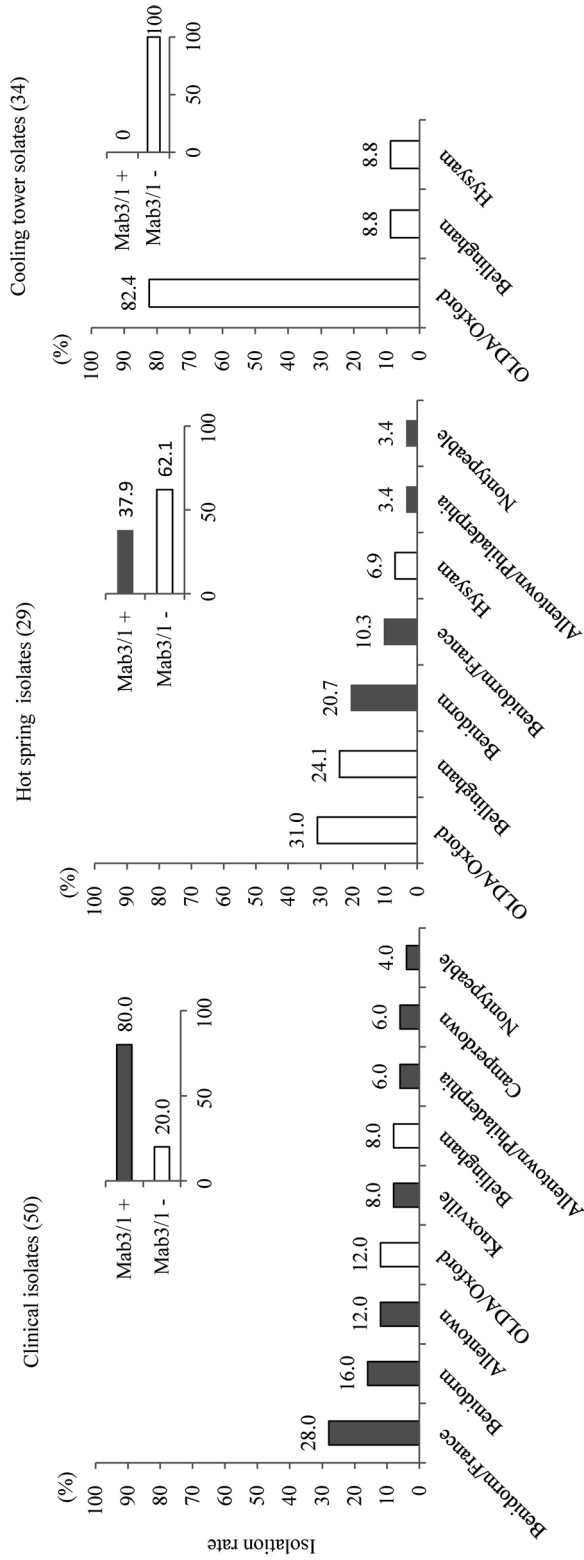


Fig. 1 PCR based MAb subgroups in the SG1 isolates of *L. pneumophila* from each source area

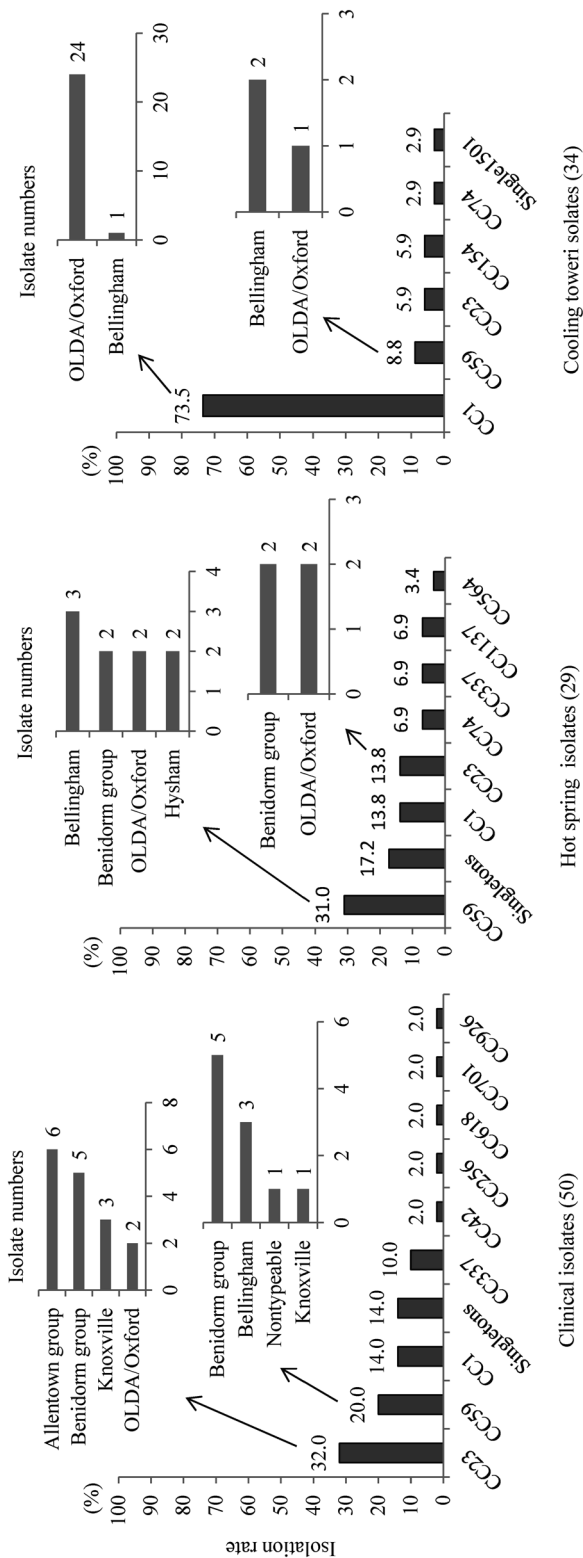


Fig. 2 Clonal complex type by sequence based typing in the SG1 isolates of *L. pneumophila* from each source area



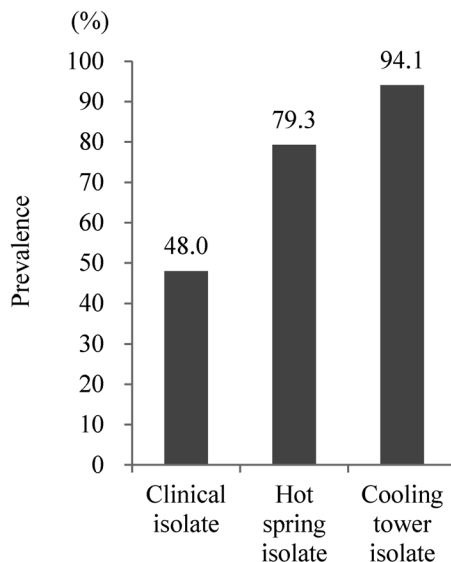


Fig. 3 Prevalence of strain-specific Lvh type IV SS in the SG1 isolates of *L. pneumophila* from each source area

臨床分離株では CC23/Lvh type IVA SS 陽性/65-kb 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/65-kb PI 陽性の TUM14301 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/65-kb 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/65-kb PI 陽性の TUM13947 が優勢となった。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 TUM14256 株、TUM14306 株、TUM13947 株による混合拮抗感染の結果を Fig. 8. に示した。0 time の感染後 3 時間では臨床分離 TUM14256 株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 株の増殖が優勢傾向を示した。

### 3.6 塩素耐性実験

環境分離株に 65-kb PI 保有率が高い結果と、65-kb PI に塩素耐性能があるとの最近の報告 (Flynn KJ・Swanson MS, (2014) との関連を検討した。あらかじめ 65-kb 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 0.03125 mg/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。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にあると判定し、その結果を Fig. 10 に示した。

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 65-kb 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 65-kb PI 陰性であった。

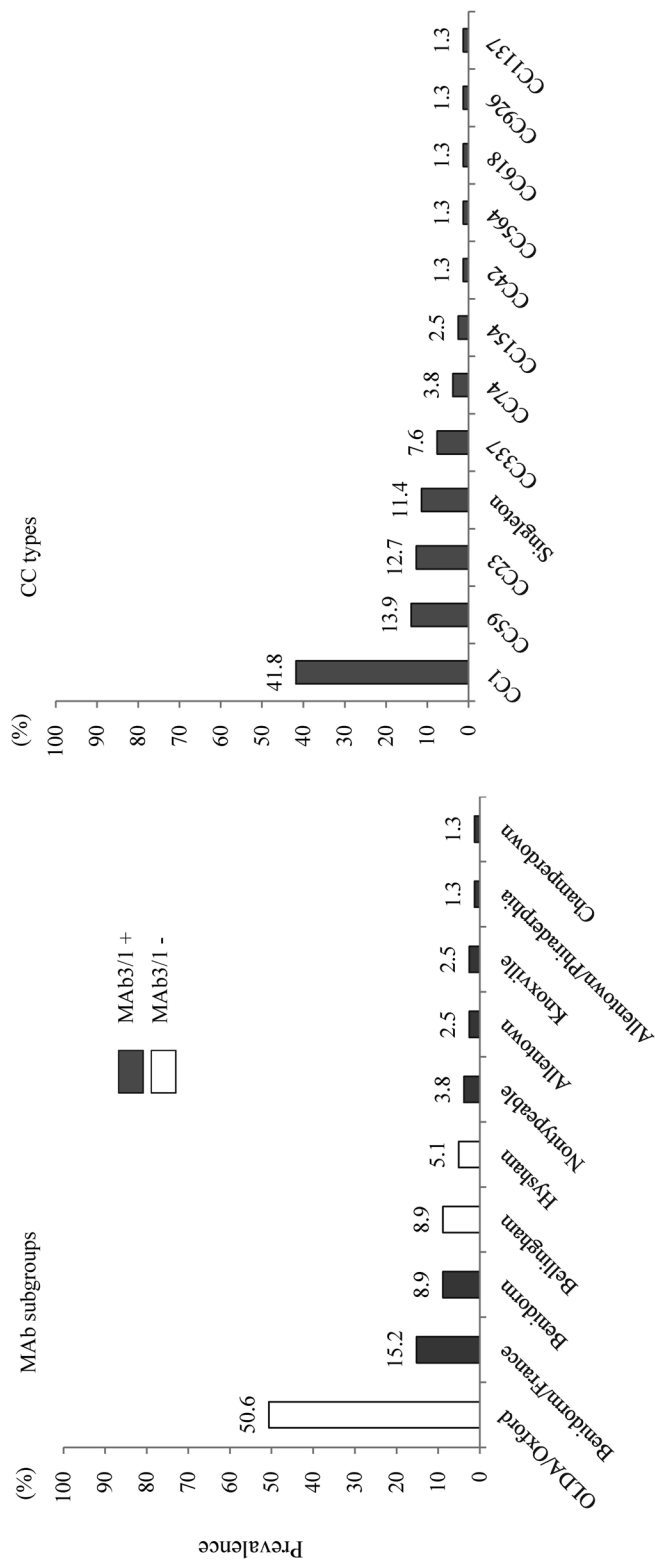


Fig. 4 Prevalence of Lvh type/VA SS in *L. pneumophila* SG1 MAb subgroups and CC types

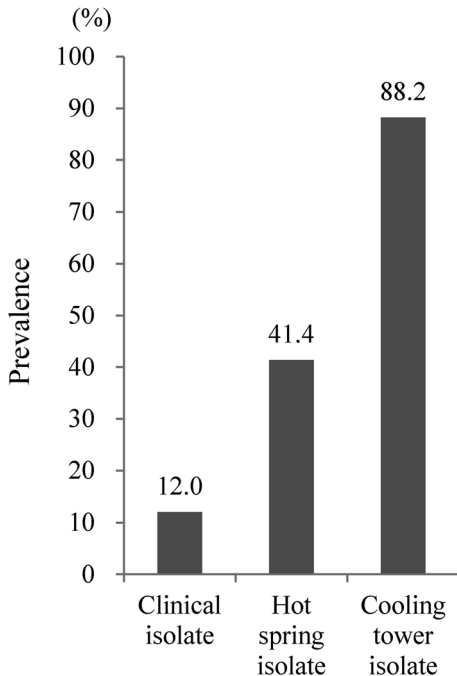


Fig. 5 Prevalence of strain-specific 65-kb PI in the SG1 isolates of *L. pneumophila* from each sources

#### 4. 考 察

ヨーロッパを中心とする世界の5,000以上のデータポイントから集められたELDSNetデータベースによれば、臨床分離株で最も優勢なSG1 subgroupはAllentown/Franceである(<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/legionnaires-disease-europe-2014.pdf>). しかし本研究からは、本邦ではBenidorm系が最も優勢でヨーロッパとは異なる様相が示された。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。これらの結果は最近のAmemura-Maekawaらの報告と一致した(Amemura-Maekawa J *et al.* (2010; Amemura-Maekawa J *et al.* (2012)). しかし温泉分離株ではSG1 subgroupは比較的多彩で、臨床分離株で最も優勢なBenidorm系が、温泉分離株でも優勢なSG1 subgroupとして分布していた。一方冷却塔水分離株にはBenidorm系は本調査では存在しなかった。

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 type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は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ヨーロッパや冷却塔水と異なり、最も優勢なCC typeはCC59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 type/SG1 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循環温泉施設にあることとの関連が強く示唆された。

ヨーロッパにおける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水は火山性由来も多くあり水質も多彩である。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もしれない。

一方、*L. pneumophila*SG1においてLPS構造上のMAb3/1陽性エピトープが病原性に関係するとされている(Zahringer U *et al.*, 1995; Zou CH *et al.*, 1999)。MAb3/1陽性エピトープ保有株は、臨床分離株において顕著に高い。そのため*Acanthamoeba*における拮抗感染実験において、臨床分離株でMAb3/1陽性のTUM14256(Benidorm/France, CC23)が、MAb3/1陰性温泉水分離TUM14306(Bellingham, CC59)および同じくMAb3/1陰性冷却塔水分離TUM 13947(OLDA/Oxford, CC1)よりも競合してアメーバ内で有意に優勢に増殖すると予想した。実際、拮抗感染後3時間では、MAb3/1陽性TUM14256株が優勢に増殖した。成績には示していないが、各菌株単独感染においてはすべて同等のアメーバ内増殖性を示している。またすべての*L. pneumophila*が

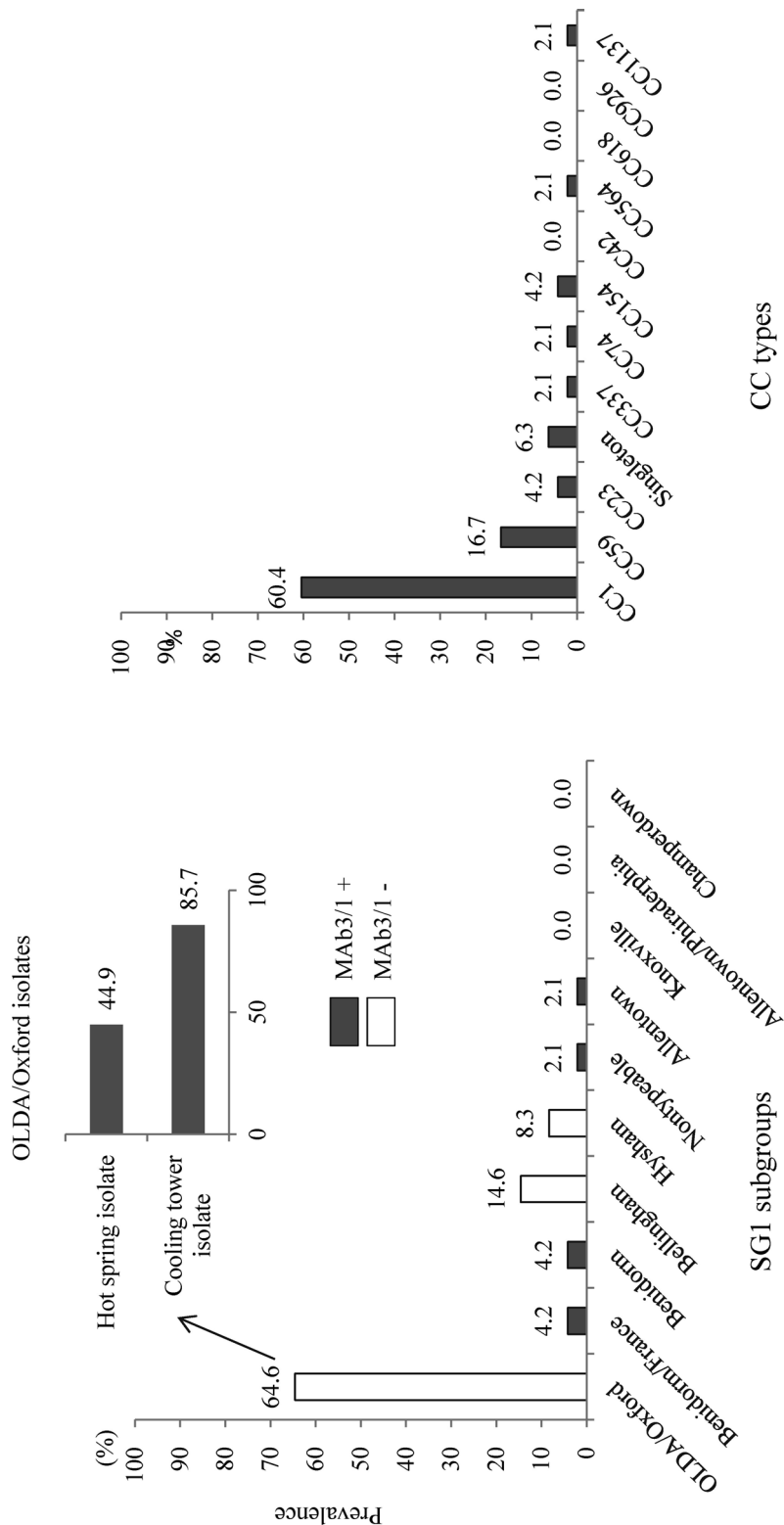


Fig. 6 Prevalence of 65-kb PI in the SG1 subgroups and the CC types of *L. pneumophila*

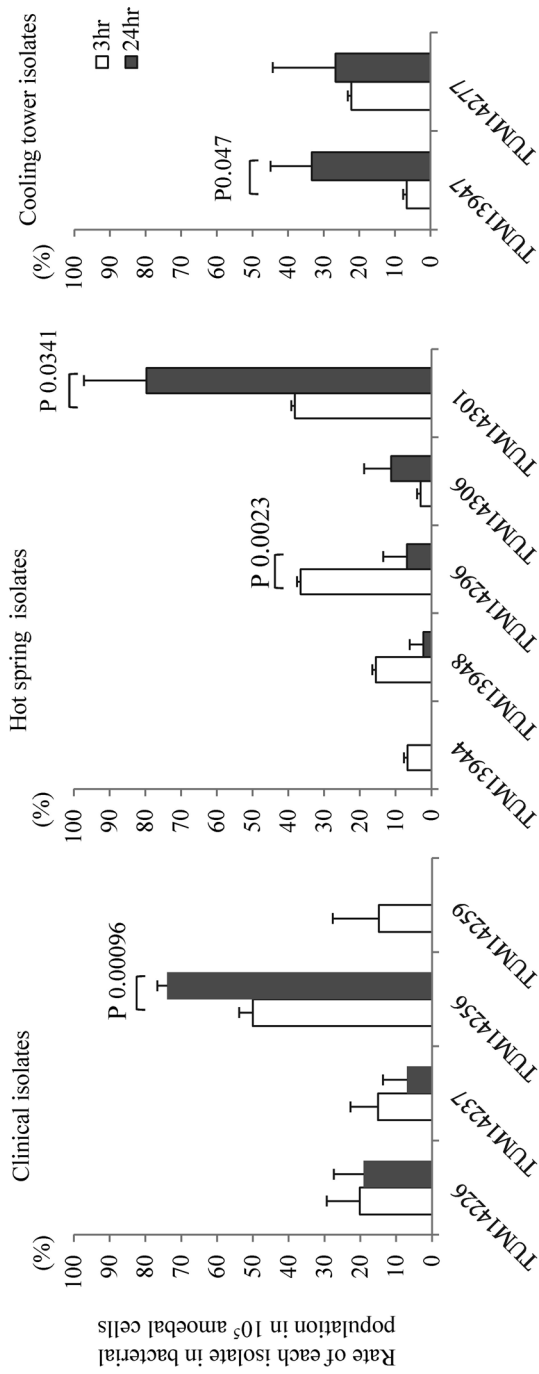


Fig. 7 Competitive infection experiment of *L. pneumophila* for *A. castellanii* ATCC30234

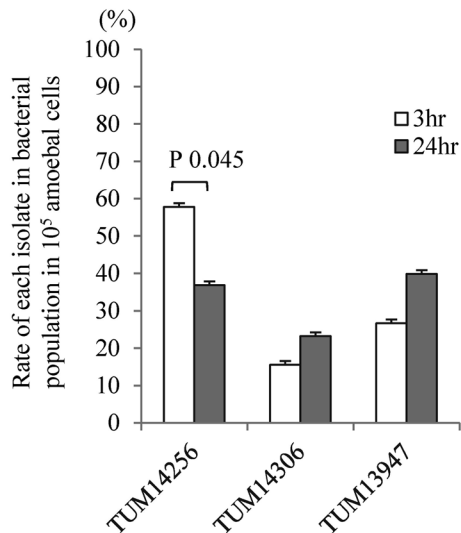
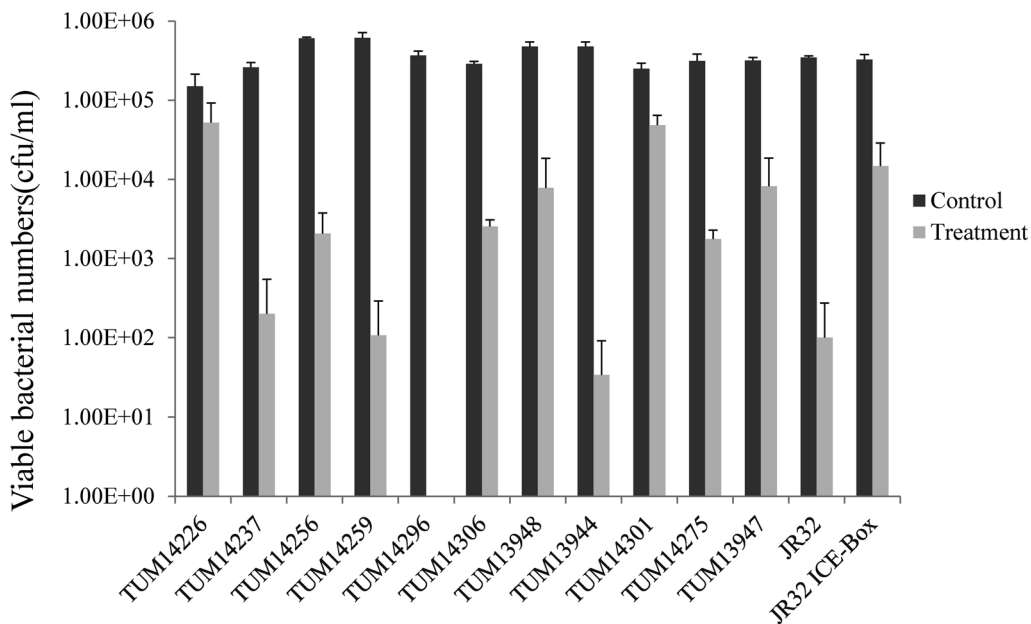


Fig. 8 Competitive infection experiment of *L. pneumophila* by the representative isolate of each source increased dominantly at 24h after infection in *A. castellanii* ATCC30234



Each isolate was exposed for 90 seconds by choline of 0.03125mg/L

Fig. 9 Choline tolerance ability of each representative isolates of *L. pneumophila* used in the competitive experiment for acanthamoeba

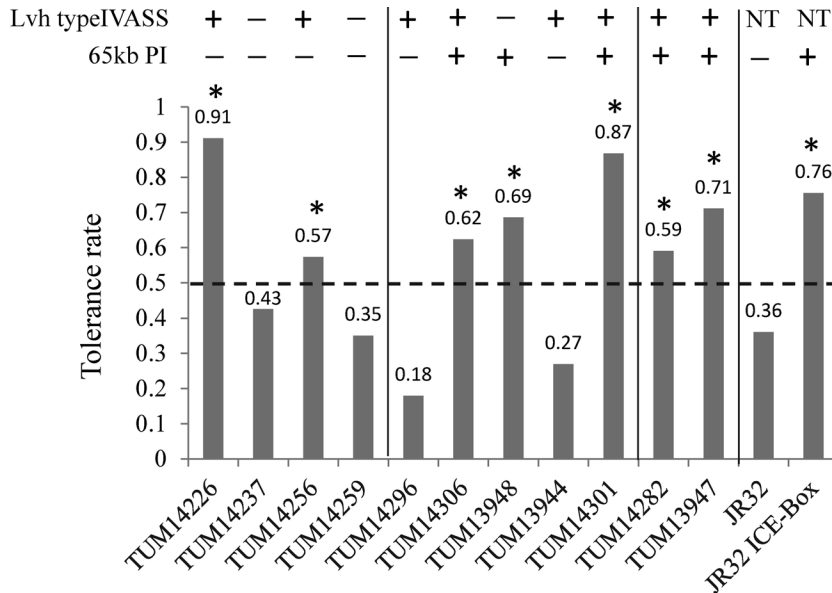


Fig. 10 Choline tolerance ability of each representative isolate of *L. pneumophila*  
Tolerance rate expressed as treatment value (log)/control value (log) in Fig. 9  
NT : not test

共有することが知られている重要な病原性因子, Type I, II, IVB SS, あるいは細胞侵入に関連する *enhC* 遺伝子, さらには細胞内からの脱出に関連する *rtx* 遺伝子は, これら菌株はすべて保有していた (成績未提示). これらのことから感染 3 時間で MAb3/1 陽性 TUM14256 株が優勢に増殖した結果は, MAb3/1 エピトープが初期感染に重要な役割を果たしたものと推定された.

MAb3/1 病原性エピトープに関しては, MAb3/1 陽性エピトープを有する LPS が高度に O-アセチル化されているため強い疎水性を示し, そして疎水性の LPS 構造が, *L. pneumophila* の宿主細胞への付着に重要な役割を果たすことが報告されている (Zahringer U, *et al*, (1995)). さらに MAb3/1 陽性エピトープによって電荷密度の低下が生じ, それによる初期の長距離斥力が, 負に荷電された宿主細胞に対する感染過程に重要な役割を果たす可能性も報告されている (Gosselin F *et al*, (2011)). これらの結果および文献から, 温泉水分離株には MAb3/1 陽性エピトープを保有し, 臨床分離株に優勢な Benidorm 系が, ある程度優勢に存在することから, これらの菌株が温泉に存在した場合, 人に対する感染が容易となり, その結果が臨床分離株における Benidorm 系の優勢な存在に関係しているものと本研究結果から推定した.

しかし感染後 24 時間では臨床分離株 TUM14256 はアメーバ内で有意な減少を示し, アメーバ内での増殖が抑制されているように見える. それに対して冷却塔水分離株 TUM13947 および温泉水分離株 TUM14306 は感染後 24 時間で有意差は示されなかったが増加傾向を示した. *L. pneumophila* は全体の約 1 割の遺伝子を外部から獲得している. これらの遺伝子は菌株に特異的であり, 一部の各菌株の病原性あるいは環境中における生残能に関係するとされる. 特に Lvh type IVA SS は自然環境の低温下での生残や宿主細胞内での増殖に関与し (Huang B *et al*, (2006); Samrakandi MM *et al*, (2002); Samrakandi MM *et al*, (2002)), また 65-kb PI も同様に, 自然環境での宿主細胞内での生残するための形態変化および増殖に重要な役割をすると報告されている (Brassinga AK *et al*, (2003); Hiltz MF *et al*, (2004)). 上記 3 菌株は, それぞれの由来の特徴を代表する菌株を用い

Table 3A Characteristics of each isolate in clinical isolates group

TUM No.	ST	CC	PCR based subgroup	MAb3/1	Lvh TypeIVA	65-kb PI
TUM14213	92	Singleton92	Camperdown	+	-	-
TUM14214	1	CC1	OLDA/Oxford	-	+	+
TUM14215	143	Singleton143	Nontypeable	+	+	-
TUM14216	120	CC23	Benidorm	+	-	-
TUM14217	130	CC1	Benidorm/France	+	-	-
TUM14218	132	CC23	Allentown	+	-	-
TUM14219	131	CC59	Benidorm	+	-	-
TUM14220	1	CC1	OLDA/Oxford	-	+	+
TUM14221	89	Singleton89	Benidorm	+	-	-
TUM14222	92	Singleton92	Camperdown	+	-	-
TUM14223	23	CC23	Allentown	+	+	-
TUM14224	22	CC23	OLDA/Oxford	-	+	-
TUM14225	138	CC337	Benidorm/France	+	+	-
TUM14226	1494	CC59	Benidorm/France	+	+	-
TUM14227	256	CC256	Bellingham	-	-	-
TUM14228	1008	CC1	OLDA/Oxford	-	+	+
TUM14229	612	Singleton612	Benidorm/France	+	+	-
TUM14230	131	CC59	Bellingham	-	-	-
TUM14231	unknown	CC59	Benidorm/France	+	-	-
TUM14232	131	CC59	Bellingham	-	-	+
TUM14233	23	CC23	Allentown/Philaderphia	+	-	-
TUM14234	23	CC23	Allentown	+	-	-
TUM14235	42	CC42	Benidorm/France	+	+	-
TUM14236	1496	CC1	Benidorm/France	+	+	-
TUM14237	1497	CC59	Benidorm/France	+	-	-
TUM14238	120	CC23	Benidorm	+	-	-
TUM14239	979	CC337	Benidorm/France	+	+	-
TUM14240	23	CC23	Allentown/Philaderphia	+	-	-
TUM14241	120	CC23	Benidorm	+	-	-
TUM14242	142	CC59	Benidorm	+	+	-
TUM14243	138	CC337	Benidorm/France	+	+	-
TUM14244	138	CC337	Benidorm/France	+	+	-
TUM14245	1499	Singleton1499	OLDA/Oxford	-	+	-
TUM14246	120	CC23	Knoxville	+	+	-
TUM14247	1189	CC23	Knoxville	+	+	-
TUM14248	118	CC926	Allentown	+	+	-
TUM14249	1493	CC23	Knoxville	+	-	-
TUM14250	434	Singleton434	Benidorm	+	+	-
TUM14251	20	CC23	Allentown	+	-	-
TUM14252	138	CC337	Camperdown	+	+	-
TUM14253	575	CC23	OLDA/Oxford	-	-	-
TUM14254	531	CC59	Nontypeable	+	+	-
TUM14255	1498	CC618	Benidorm/France	+	+	-
TUM14256	384	CC23	Benidorm/France	+	+	-
TUM14257	37	CC1	Allentown	+	-	-
TUM14258	551	CC59	Knoxville	+	-	-
TUM14259	120	CC23	Benidorm/France	+	-	-
TUM14260	211	CC1	Allentown/Philaderphia	+	-	+
TUM14261	1500	CC701	Benidorm	+	-	-
TUM14262	356	CC59	Bellingham	-	-	+



Table 3B Characteristics of each isolate in hot spring isolates group

TUM No.	ST	CC	PCR based subgroup	MAb3/1	Lvh TypeIVA	65-kb PI	Source
TUM14296	1151	CC1137	Bellingham	-	+	-	神奈川
TUM14297	59	CC59	Benidorm/France	+	+	+	埼玉
TUM14309	1761	CC564	Nontypeable	+	+	+	東京
TUM13948	1151	CC1137	OLDA/Oxford	-	-	+	埼玉
TUM14298	1509	Singleton1509	Benidorm	+	+	-	東京
TUM14299	1	CC1	Allentown/Philadelphia	+	+	-	岡山
TUM14300	1448	CC23	Benidorm	+	+	+	愛知
TUM14314	1760	Singleton1760	Benidorm	+	+	+	福岡
TUM14301	1	CC1	OLDA/Oxford	-	+	+	岐阜
TUM13944	1758	CC23	Benidorm	+	+	-	広島
TUM14302	1502	Singleton1502	Bellingham	-	+	-	長崎
TUM14303	604	CC59	Hysham	-	+	-	茨城
TUM14304	1254	CC59	OLDA/Oxford	-	+	-	宮城
TUM14305	138	CC337	Benidorm/France	+	-	+	京都
TUM14306	552	CC59	Bellingham	-	+	+	大阪
TUM14308	1	CC1	Bellingham	-	+	+	兵庫
TUM14310	22	CC23	OLDA/Oxford	-	+	-	山梨
TUM14311	1507	CC74	OLDA/Oxford	-	+	-	岩手
TUM14312	1503	CC59	Hysham	-	-	+	和歌山
TUM14307	1759	Singleton1759	Benidorm	+	-	-	秋田
TUM14313	129	CC59	Bellingham	+	-	-	奈良
TUM14315	138	CC337	Benidorm/France	+	+	-	山形
TUM14316	129	CC59	Bellingham	-	-	-	山形
TUM14317	48	CC74	Bellingham	-	+	-	東京
TUM14318	1504	Singleton1504	OLDA/Oxford	-	+	+	和歌山
TUM14319	1	CC1	OLDA/Oxford	-	+	+	和歌山
TUM14320	1100	CC59	Benidorm	+	+	-	山形
TUM14321	448	CC23	OLDA/Oxford	-	+	-	山形
TUM14322	1508	CC59	OLDA/Oxford	-	+	-	群馬

た、各由来代表菌株間同士の拮抗感染実験においても、感染後24時間で *Acanthamoeba* 内で有意に高い増殖性を示した菌株は、臨床分離株では Lvh type IVA SS のみ陽性の TUM14256 株 (Benidorm/France, CC23) であり、温泉水分離株では両因子陽性の TUM14306 株 (Bellingham, CC59)、そして冷却塔水由来株でも両因子陽性の TUM13947 株 (OLDA/Oxford, CC1) であった。従ってこの結果からは少なくともこれらの因子が自然界の *L. pneumophila* の宿主である *Acanthamoeba* 内での侵入後後期の増殖に重要な役割を果たすことが示唆された。しかしこれら3菌株による拮抗感染実験では Lvh type IVA SS だけ陽性の TUM14256 が24時間で有意な減少を示し、両因子陽性の2菌株が24時間で増殖傾向を示したことから、65-kb PI の役割がより大きいことが推定された。いずれにしろ菌株特異的因子である Lvh type IVA SS および 65-kb PI を保有する株が自然環境宿主内でより優位に生残する可能性が高いことが明らかになった。

一方最近 65-kb PI に塩素耐性能が存在するとの最近の報告がなされた (Flynn KJ・Swanson MS. (2014))。そこで、65-kb PI 非保有、保有の isogenic strains を用い、65-kb PI に塩素耐性能が存在することを確認した上で今回調査した 65-kb PI 保有株に塩素耐性能が見られるかを検討した。その結果、65-kb PI 保有株に塩素耐性あるいは塩素耐性傾向が認められた。本研究において、65-kb 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、保有率は温泉水分離株に比べ、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 (硫黄) 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

Table 3C Characteristics of each isolate in cooling tower isolates group

TUM No.	ST	CC	PCR based subgroup	Lvh Type	VA SS	65-kb PI	Source
TUM14263	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	神奈川
TUM14264	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	岐阜
TUM14265	59	CC59	Bellingham		+	+	山梨
TUM14266	1505	CC1	OLDA/Oxford		+	+	神奈川
TUM14267	1505	CC1	OLDA/Oxford		+	+	神奈川
TUM14268	556	CC1	OLDA/Oxford		+	+	大阪
TUM14269	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	東京
TUM14270	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	神奈川
TUM14271	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	静岡
TUM14272	1	CC1	OLDA/Oxford		+	-	東京
TUM14273	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	福岡
TUM14274	22	CC23	OLDA/Oxford		-	-	福岡
TUM14275	1	CC1	OLDA/Oxford		+	-	三重
TUM14276	986	CC154	Hysham		+	+	京都
TUM14277	1	CC1	OLDA/Oxford		+	-	福島
TUM14278	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	熊本
TUM14279	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	兵庫
TUM14280	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	宮城
TUM14281	1501	Singleton1501	Hysham		+	+	長野
TUM14282	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	北海道
TUM14283	1506	CC59	OLDA/Oxford		+	+	石川
TUM14284	45	CC74	OLDA/Oxford		+	+	埼玉
TUM14285	22	CC23	OLDA/Oxford		+	+	愛知
TUM14286	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	志賀
TUM14287	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	茨城
TUM14288	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	奈良
TUM13947	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	岡山
TUM14289	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	長崎
TUM14290	1	CC1	Bellingham		+	+	大分
TUM14291	1471	CC154	Hysham		+	+	岩手
TUM14292	1008	CC1	OLDA/Oxford		+	+	広島
TUM14293	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	山形
TUM14294	1	CC1	OLDA/Oxford		+	+	香川
TUM14295	59	CC59	Bellingham		-	+	千葉

離株に 65-kb 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 65-kb 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 65-kb PI は陰性であったが、塩素耐性を示した 2 株の Benidorm 系が存在した。これらの菌株は、65-kb PI 以外に未知の塩素耐性因子が存在し、このことも Benidorm 系が温泉や、あるいは臨床において優勢な要因となっている可能性が考えられた。

## 謝 辞

本研究は文科省科研費 MEXT KAKENHI (24510038) によるサポートを受けました。また環境分離株の一部のご提供に対し、株式会社アクアス筑波研究所に深謝いたします。秋田大学付属病院中央検査部の嵯峨知生先生には技術的アドバイスをいただき深謝いたします。ミシガン大学医学部 Michele S. Swanson 教授からの、*L. pneumophila* JR32 株、*L. pneumophila* JR32 ICE-Box 株の

分与に対し深謝いたします。

## 引用文献

- Yu, V.L., Plouffe, J.F., Pastoris, M.C., Stout, J.E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C.M., Paterson, D.L. and Chereschsky A. (2002) : Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis : an international collaborative survey, *J. Infect. Dis.*, **186**, 127-128.
- Joly, J.R., McKinney, R.M., Tobin, J.O., Bibb, W.F., Watkins, I.D. and Ramsay, D. (1986) : Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies, *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 768-771.
- Helbig, J.H., Bernander, S., Castellani-Pastoris, M., Etienne, J., Gaia, V., Lauwers, S., Lindsay, D., Luck, P.C., Marques, T., Mentula, S., Peeters, M.F., Pelaz, C., Struelens, M., Uldum, S.A., Wewalka, G. and Harrison, T.G. (2002) : Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease : distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **21**, 710-716.
- Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Helbig, J.H., Chang, B., Kaneko, A., Watanabe, Y., Isobe, J., Nukina, M., Nakajima, H., Kawano, K., Tada, Y., Watanabe, H. and Working Group for Legionella in Japan. (2010) : Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types, *J. Med. Microbiol.*, **59**, 653-659.
- Amemura-Maekawa, J., Kikukawa, K., Helbig, J.H., Kaneko, S., Suzuki-Hashimoto, A., Furuhashi, K., Chang, B., Murai, M., Ichinose, M., Ohnishi, M., Kura, F. and Working Group for Legionella in Japan. (2012) : Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan, *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 4263-4270.
- Zahringer, U., Knirel, Y.A., Lindner, B., Helbig, J.H., Sonesson, A., Marre, R. and Rietschel ET. (1995) : The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1) : chemical structure and biological significance, *Prog. Clin. Biol. Res.*, **392**, 113-139.
- Zou, C.H., Knirel, Y.A., Helbig, J.H., Zahringer, U. and Mintz, C.S. (1999) : Molecular cloning and characterization of a locus responsible for O acetylation of the O polysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide, *J. Bacteriol.*, **181**, 4137-4141.
- Luck, P.C., Freier, T., Steudel, C., Knirel, Y.A., Luneberg, E., Zahringer, U. and Helbig, J.H. (2001) : A point mutation in the active site of *Legionella pneumophila* O-acetyltransferase results in modified lipopolysaccharide but does not influence virulence, *Int. J. Med. Microbiol.*, **291**, 345-352.
- Gosselin, F., Duval, J.F., Simonet, J., Ginevra, C., Gaboriaud, F., Jarraud, S. and Mathieu L. (2011) : 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*, **82**, 283-290.
- Seeger, E.M., Thuma, M., Fernandez-Moreira, E., Jacobs, E., Schmitz, M. and Helbig J.H. (2010) : Lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* shed in a liquid culture as a nonvesicular fraction arrests phagosome maturation in amoeba and monocytic host cells, *FEMS. Microbiol.*

- Lett, **307**, 113-119.
- Laura, G. and Carmen, B. (2013) : Genome Dynamics in *Legionella* : The Basis of Versatility and Adaptation to intracellular Replication, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- D'Auria, G., Jimenez-Hernandez, N., Peris-Bondia, F., Moya, A. and Latorre A. (2010) : *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors, BMC. Genomics, **11**, 181.
- Bandyopadhyay, P., Liu, S., Gabbai, C.B., Venitelli, Z. and Steinman H.M. (2007) : Environmental mimics and the Lvh type IVA secretion system contribute to virulence-related phenotypes of *Legionella pneumophila*, Infect. Immun, **75**, 723-735.
- Brassinga, A.K., Hiltz, M.F., Sisson, G.R., Morash, M.G., Hill, N., Garduno, E., Edelstein, P.H., Garduno, R.A. and Hoffman, P.S. (2003) : A 65-kilobase pathogenicity island is unique to Philadelphia-1 strains of *Legionella pneumophila*, J. Bacteriol, **185**, 4630-4637.
- Flynn, K.J. and Swanson, M.S. (2014) : Integrative conjugative element ICE- $\beta$  ox confers oxidative stress resistance to *Legionella pneumophila* in vitro and in macrophages, MBio, **5**, e01091-14
- Thurmer, A., Helbig, J.H., Jacobs, E. and Luck, P.C. (2009) : PCR-based 'serotyping' of *Legionella pneumophila*, J. Med. Microbiol, **58**, 588-595.
- Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P. and Spratt, B.G. (2004) : eBURST : inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data, J. Bacteriol, **186**, 1518-1530.
- Ohno, A., Kato, N., Sakamoto, R., Kimura, S. and Yamaguchi K. (2008) : Temperature-dependent parasitic relationship between *Legionella pneumophila* and a free-living amoeba (*Acanthamoeba castellanii*), Appl. Environ. Microbiol, **74**, 4585-4588.
- Zahringer, U., Knirel, Y.A., Lindner, B., Helbig, J.H., Sonesson, A., Marre, R. and Rietschel, E.T (1995) : The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1) : chemical structure and biological significance, Prog. Clin. Biol. Res, **392**, 113-139.
- Huang, B., Yuan, Z., Heron, B.A., Gray, B.R., Eglezos, S., Bates, J.R. and Savill, J. (2006) : Distribution of 19 major virulence genes in *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and water in Queensland, Australia. J. Med. Microbiol, **55**, 993-997.
- Samrakandi, M.M., Cirillo, S.L., Ridenour, D.A., Bermudez, L.E. and Cirillo, J.D. (2002) : Genetic and phenotypic differences between *Legionella pneumophila* strains, J. Clin. Microbiol, **40** : 1352-1362.
- Samrakandi, M.M., Ridenour, D.A., Yan, L. and Cirillo, J.D. (2002) : Entry into host cells by *Legionella*, Front. Biosci, **7** : d1-11
- Hiltz MF, Sisson GR, Brassinga AK, Garduno E, Garduno RA. and Hoffman PS. (2004) : Expression of magA in *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 is developmentally regulated and a marker of formation of mature intracellular forms. J. Bacteriol, **186**, 3038-3045.