

厚生労働科学研究費補助金  
厚生労働科学特別研究事業

## 生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究

平成 14 年度研究報告書

平成 15 年 3 月

主任研究者：吉 田 真 一

(九州大学大学院医学研究院教授)

## 目 次

I. 研究の概要	1
II. 研究の成果	7
1. レジオネラの生態に関する研究	7
2. レジオネラの病原性に関する研究	23
3. 遺伝子診断法に関する研究	47
4. 検査機関の精度管理に関する調査研究	80
5. 臨床検査法によるレジオネラ検出陽性率の調査	93
6. レジオネラ検査法の比較研究	105
7. レジオネラ症集団発生への対応	111
8. 知識普及と啓蒙のための総説	116

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）  
研究報告書

生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究

主任研究者 吉田 真一（九州大学大学院医学研究院細菌学分野教授）

研究要旨

研究課題である「生活環境におけるレジオネラ感染予防」を実現するためには、生活環境におけるレジオネラの生態を把握し、正確で迅速に環境中のレジオネラを検出する方法を開発して普及し、レジオネラの環境中での増殖をコントロール（感染源・感染経路対策）しなければならない。また、感染が起こった場合には重症化を防ぐことが大切であり、そのためには、迅速で正確な臨床検査法を開発・普及し、早く正しい治療を開始できる医療環境を整備することが必要である。これらを実現するために研究班では以下のような分担研究を行い、それぞれの成果を得た。

分担研究者氏名

藪内英子（岐阜大学大学院医学研究科微生物・バイオインフォマティクス）

江崎孝行（岐阜大学大学院医学研究科微生物・バイオインフォマティクス）

宮本比呂志（産業医科大学医学部微生物）

大井田隆（日本大学医学部公衆衛生学）

研究協力者

史君 綽、大西 裕子、朴 貞玉、Oksana Barysheva（九州大学大学院医学研究院）

河村好章（岐阜大学大学院医学研究科）

谷口初美、石松維也（産業医科大学）

井深英治、三宅健夫（日本大学医学部）

有馬恵子（株・新日化環境エンジニアリング）

縣 邦雄（アクアス株式会社つくば総合研究所）

はじめに

平成 12 年 3 月から 4 月にかけて静岡県掛川市の入浴施設でレジオネラ集団感染があり、患者の届出 23 名、死者 2 名を出した。さらに同年 6 月には茨城県石岡市の入浴施設利用者のうち 43 名がレジオネラ肺炎と診断され、うち 3 名が死亡した。さらに平成 14 年 7 月には宮崎県日向市の温泉施設で患者の届出 200 人以上死亡 7 名にのぼるレジオネラによる集団感染が発生し、続いて 8 月鹿児島県東郷町の温泉施設でもレジオネラ肺炎により 1 名が死亡した。このように最近いわゆる「温泉施設」でレジオネラ集団感染が多発している。これらの集団発生に共通していることは感染源が循環濾過式風呂であること、高齢者を中心に死者が出ていることである。このことは循環式浴槽の細菌学的衛生管理が不徹底でレジ

オネラが浴槽水中で増殖していること、高齢者は感受性が高いこと、レジオネラ感染症の早期診断が遅れ適正な治療が遅れた可能性などを示唆する。

一方、レジオネラ感染症は平成 11 年 4 月に施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」により、四類感染症に分類され、全臨床医に届け出義務が課せられることになった。その後、平成 14 年 12 月までの 3 年 9 ヶ月の間に 465 例のレジオネラ感染患者が届けられ、うち 34 名（7.3%）が死亡している。しかし、レジオネラ属細菌の分離同定検査、遺伝子診断、血清検査による診断法が健康保険の適用になっていないため、十分な起炎菌の検査が行われておらず、かなりのレジオネラ感染が見落とされていると考えられる。

本研究班は国内で発生しているレジオネラ感染症の全容を把握し、適正な診断・治療、効果的な予防についての方策を立てることを最終目標として組織された。レジオネラ感染症を予防するには感染源、感染経路対策が基本となる。欧米では水冷式クーラーシステムの冷却塔水がレジオネラの感染源であり、夏に患者発生のピークがあるのに対して、日本では循環濾過式浴場が主な感染源、特に集団感染のそれであり、従って患者発生も季節を問わないのが特徴である。感染源は人工的水利用設備であることが多いので、レジオネラ属のこれら環境中での生態を理解した上で、増殖を抑制する手法を確立することが重要である。感染経路は経気道感染であるので、エアロゾルの発生を抑制することが重要である。さらに患者を早期に診断し適正な治療を施す必要がある。

現在世界的にレジオネラ研究の興味はマ

クロファージ内での増殖機序に集中しており、病原性を担う遺伝子やタンパクの同定など細かい解析が進行している。しかし、レジオネラ属菌の多様性や環境中での生態、感染後の病態形成、診断、治療に関して重要で未解決の、興味有る課題が多く残されている。たとえば、なぜ *L. pneumophila* が患者から分離される頻度が高いのか、冷却塔水と24時間風呂では *L. pneumophila* の血清群の分布がなぜ異なるのか、その他の菌種についてはどうか、レジオネラ肺炎とポンティアック熱の二つの病型はどのようにして決まるのか、感染防御因子はガンマ・インターフェロンで活性化されたマクロファージだけなのか、などである。

研究班は以下の考え方に沿って組織された。

- 1) 細菌感染症の発生や流行を理解するためには病原細菌の病原性について研究するだけでは不十分で、細菌の自然環境中での生態を理解することが不可欠である。
- 2) 感染症は病原体と生体の出会いの結果であるから感染症を理解するためには病原体側と生体側の両方から同時に研究できる体制が必要である。
- 3) レジオネラ属の遺伝学的性質や病原性の多様性に注目すること。
- 4) 多菌種・多血清型のレジオネラ属菌を自然界から同時に検出する技術を開発することが急がれること。
- 5) 48 菌種のレジオネラが患者の起炎菌となり得ることに対応できる鑑別・同定技術を開発すること。
- 6) 検査機関のレジオネラ検査の質を向上させる必要があること。
- 7) 現場で働く人々、一般利用客、行政担当者への知識の普及が不可欠である。

#### A. 研究目的 および B. 研究方法

本研究班では以下の内容について調査研究を実施することを計画した。

- 1) 冷却塔水や循環式浴槽水におけるレジオネラの生態の研究

レジオネラは淡水や湿った土壌、人工的水利用設備に生息し、細菌捕食性原虫の中で増殖していると考えられている。また、レジオネラはバイオフィーム中に生息していることも報告されている。しかし、レジオネラ自身がバイオフィームを形成するかどうかは明らかでないのでこの点を明らかにする。さらに *L. pneumophila* はバイオフィームを形成する能力が高いかどうか明らかにする。またバイオフィーム形成菌は熱殺菌に対し、抵抗性が高いことが予想されるので、熱殺菌を水中にいる浮遊状態、バイオフィーム中にいる状態およびアメーバに食された状態で比較する。

- 2) レジオネラ属菌の病原性と多様性に関する研究

レジオネラ感染には肺炎型（在郷軍人病）と非肺炎型のポンティアック熱という二つの病型がある。*L. anisa* や *L. feeleii* のようにポンティアック熱しか起こさない菌種もあるが、*L. pneumophila* serogroup 1 のように同じ菌種・血清型で両方の病型を引き起こすこともある。その理由を明らかにする。

レジオネラ属は現在 48 菌種が報告されている。その中で *L. pneumophila* の病原性に関する研究が最も進んでいるが、他の菌種も病原性がありその機序も多様であることが示唆されている。本研究では *L. dumoffii* の病原性について解析する。

- 3) レジオネラ症の早期診断法の開発

レジオネラ症の診断は細菌学的診断として菌の分離同定、PCR による遺伝子診断があり、ペア血清による血清学的診断がある。また最近、簡便で感受性もよい診断法として尿中抗原の検出キットによる方法が開発された。しかし尿中抗原の検出以外はいずれも健康保険適用がなく、保険適用された尿中抗原の検出も *L. pneumophila*、しかもその血清群 1 型だけの診断にしか使えないという制限がある。レジオネラ属菌の中で、一番患者が多いのは *L. pneumophila* でしかも血清群 1 が多いが、その他にも 47 菌種のレジオネラ属菌がある。このような多様な菌種、血清群の診断を同時に迅速に可能にする方法として DNA チップを使う方法が有効であるので、この開発を行う。

- 4) 検査機関のレジオネラ検査の精度管理に関する調査研究

レジオネラの同定・菌数測定検査が可能であると公表している公立・私立の検査機関は多い。しかしその精度がどの程度であるかの評価は全くなされていない。今回その評価のために菌を検査機関に送り検査の正確さを調べる。

- 5) 臨床検体からのレジオネラ検出陽性率の調査

臨床検体、環境水のサンプルから各種レジオネラ検査法を用いて、どの程度の検査陽性率があるのか検査機関を調査する。

これらの研究によって循環濾過式浴槽などを感染源とするレジオネラ感染の予防、患者が発生した場合の早期診断、早期治療、重症化の予防に貢献できると期待される。

#### C. 研究結果 および D. 考察

## 1. レジオネラの生態に関する研究

### 1) バイオフィーム形成の研究

レジオネラは環境中ではアメーバの中で増殖し、また、固形物表面に付着してバイオフィームを形成する。バイオフィームの形成能を菌種間で比較し、*L. pneumophila* が最も高いことを明らかにした。総計38種50株のレジオネラ属菌をBYE (Buffered Yeast Extract) 培地で静止培養し、25、37、42℃の温度下でガラス壁にバイオフィームを形成するか否かを観察した。興味深いことに、レジオネラ属菌の中でヒトから分離されることの最も多い *L. pneumophila* は調べた13株(血清群1—11)のすべてが形成し、一方、その他の菌種は調べた35株のほとんどが形成しなかった。*L. pneumophila* が他菌種よりも環境中から高率に検出され、かつヒトから分離される率も高いことの原因の一つと考えられる。このことは *L. pneumophila* を中心に感染源対策を行うことが重要であることを示す。

さらに培養温度の違いによってバイオフィームを形成する菌の形態が異なり、37℃、42℃では菌は線維状に長く伸長することを見出した。このような温度に左右されるバイオフィーム形成能及び形態の調節は、浴槽や温泉など高温な環境で生存し続ける *L. pneumophila* が有する生存機構と関わりがあると考えられる。

### 2) 熱殺菌抵抗性の研究

レジオネラ属菌に対する熱殺菌効果を *L. pneumophila* Philadelphia-1 株を用い、プランクトニック(単独浮遊菌体)、アメーバ *Acanthamoeba cubertsoni* 内、バイオフィーム内の菌に対して検討した。バイオフィームは37℃でBYE培地にて静置培養して18日目のものを実験に用いた。温度は60、65、70、72、75℃、殺菌時間は10秒、30秒、1、3、5分で検討した。熱殺菌は菌が浮遊状態、バイオフィーム内、アメーバ内であっても、70℃1分でほぼ完全に行われるが、バイオフィーム形成した菌はわずかに熱殺菌抵抗性が上がっており完全な殺菌は75℃、1分により達成されることがわかった。これは配管内にバイオフィームを形成したレジオネラの熱殺菌に必要なデータであり、現場での活用が期待される。

## 2. レジオネラの病原性に関する研究

### 1) 肺炎型とポンティアック熱の原因菌の比較研究

ポンティアック熱原因菌株の上皮細胞への付着能、侵入能は肺炎原因株に比べ10—50倍高かった。さらにレジオネラのエアロゾル曝露実験系を考案し、モルモット

を使用して肺炎原因菌株とポンティアック熱原因菌株の感染実験を行なった。臨床症状、肺組織所見などを肺炎原因菌株とポンティアック熱原因菌株で比較した。その結果、ポンティアック熱原因菌株はモルモットに肺炎を引き起こした。

### 2) *L. dumoffii* の病原遺伝子の研究

transposon mutagenesis の手法により *L. dumoffii* のマクロファージ内増殖には *DnaK* のコシャペロン *Djl* をコードする *djl* 遺伝子が必要であることを明らかにした。

### 3) 病原性の検査法に関する研究

生活環境水を感染源とするレジオネラ症予防のためには、環境水から分離されるレジオネラ属菌が病原性を持っているか否かを迅速に知ることが肝要である。そこで環境分離株の病原性を迅速且つ正確に判定する検査法(アメーバ寒天法)を開発した(感染症誌、2003年5月号掲載予定)。この方法を使用して2001年に古畑らが日本全国の表層土壌から分離した62株の病原性を調べたところ全てが病原性を持っていることが明らかになった(感染症誌、2003年2月号掲載)。ポンティアック熱原因菌も肺炎を引き起こす病原性を持っていることを明らかに発表した。

多数の環境分離株の病原性を迅速且つ正確に判定することができる「アメーバ寒天法」は、感染源同定のために有効であるだけでなく、どこどの生活環境水が危険かを評価し、レジオネラ症予防対策をとるべき生活環境水を同定するために役立つと思われる。また、本研究はポンティアック熱原因菌を弱毒株による感染症と考えて生活環境水の衛生管理を怠ることは非常に危険であることも明らかにした

## 3. 迅速遺伝子診断法の開発研究

### 1) *DnaJ* 遺伝子と16SrDNA遺伝子との組み合わせによるレジオネラ同定法

*Legionella* 属には40菌種以上が分類され、その多くが人に呼吸器疾患をおこす。そのうち *Legionella pneumophila* は特に患者からの分離頻度が高く、重要な病原体であり、3亜種、15血清型に細分されている。本研究では *Legionella* 属の全菌種を幅広く、検出する遺伝子検査方法と、*Legionella pneumophila* の全亜種と15血清型を特異的に検出する方法を作成する事を目標に実験を行った。*Legionella* 属の各菌種の heat shock タンパクである *DnaJ* 遺伝子配列を網羅的に決定し、*L. pneumophila* に特異的な検出法を作成した。また属の中でよく保存されている16SrDNA配列から属内のほとんどの菌種を増幅する検出系を作成した。これらの方法が、

実用的な感度と特異性があるかどうかを調べるために *Legionella* 属 40 菌種、および *L. pneumophila* の 15 血清型、および 類縁の非発酵性グラム陰性菌 20 菌種を使って特異性と感度の実験を行った。その結果、*Legionella* 属 primer と、*L. pneumophila* primer とともに特異的な検出ができることが実証された。検出感度は既に報告されている *mip* 遺伝子より高く *L. pneumophila* の *DnaJ* primer では 50 fg/assay の検出ができることが確認された。この研究で *DnaJ* 遺伝子は *Legionella* 属の各菌種間で 16S rDNA より、配列の違いが大きく、より進化速度が早い遺伝子であることがわかった。*L. pneumophila* の 15 種類の血清型では 16S rDNA ではほぼ同じであるが、*DnaJ* では 2 から 9% ぐらいの配列の違いがあり、鑑別に有用であることが判明した。

*Legionella* 属、および *L. pneumophila* の特異的検出方法が完成したので、この方法を用いて環境水の汚染を迅速に検査する方法を作成することができる。現在、水の汚染をモニターするため *Legionella* 属の菌種のみならず、*Mycobacteria*, *Pseudomonas*、真菌、原虫などを網羅的に検出する方法を作成しており、検出キットなどの実用化に向けた民間との共同研究に進展させている。

## 2) *rpoB* 遺伝子の PCR-RFLP による *L. pneumophila* の鑑別同定

韓国の研究者との協同研究である。レジオネラ属菌の RNA polymerase beta-subunit をコードする遺伝子 *rpoB* から、レジオネラ属と *L. pneumophila* をそれぞれ特異的に識別できる配列を PCR で増幅し、さらに制限酵素切断長多型性 restriction fragment length polymorphism を解析することにより、それぞれの識別ができることを明らかにした。

## 4. レジオネラ検査機関の精度管理に関する調査研究

レジオネラ感染に対する関心が高まり、多くの検査機関がレジオネラの同定・菌数測定検査に参画している。しかし、それら検査機関が正確なレジオネラ検査を行っているかどうかは未だに調査されていない。今回、全国の地方衛生研究所 74 施設を対象にレジオネラ属菌検出精度管理を調査した。その結果、*L. pneumophila* 血清群 7-15 に対する抗血清が普及していないこと、PCR や生化学的性状だけでの診断は誤りが多く、一方 DNA-DNA hybridization 法を導入している施設は正確な診断ができていることが明らかとなった。

## 5. 臨床検査によるレジオネラ検出陽性率

## に関する調査研究

レジオネラ感染症に関する臨床検査にはレジオネラの培養、PCR 法、血清抗体の測定、尿中抗体の検出の 4 検査法がある。民間の検査施設を調査してこれら 4 つの検査法の陽性率を比較した。民間の臨床検査機関（全国シェアの約 10% を占める）から、レジオネラ検査に関わる 4 つの項目（培養法、PCR 法、血清抗体価、尿中抗原の検出）について、資料の提供を求め、培養法（8751 検体）、PCR 法（461 検体）、尿中抗原検査（5126 検体）について、それぞれの陽性率を調べた。また、環境中の水約 4000 検体についても培養法による陽性率を調べた。培養法については 1999 年 4 月からの 4 年間の約 8700 件の検体で陽性例は数例しかなく陽性率は、ほぼ 0% に近く、PCR 法も 461 検体中、陽性例は 0 であった。一方、尿中抗原検出法に関しては調べた 5126 検体中 135 例の陽性検体を認め陽性率も 2.6% という高い値を示した。また、環境水検体による菌の培養では冷却水（陽性率 30%）、循環式浴槽（40%）で高い陽性率を示し、冷却水では *L. pneumophila* 血清群 1 が多く、循環式浴槽では *L. pneumophila* 血清群 3、5、6 が多く検出された。

尿中抗原検出法と他の検査法では陽性率に大きな差が見られ、尿中抗原検査法が有効であることを示すとともに、これまで保健適用があった培養検査のみでは感染者を見逃している可能性があることを示唆した。今年の 4 月より簡便な尿中レジオネラ抗原検出検査に保険適用（230 点）が認められ、より正確なレジオネラ感染の状況の把握が期待されるため、引き続き研究が必要と考えられる。

## 6. レジオネラ検査法の比較研究

レジオネラ検出のために、検体を濃縮し、前処置して選択培地に塗布する。濃縮法と選択培地を比較検討した。

## 7. レジオネラ感染症に関する総説

## E. 結語

この研究により、レジオネラが温度に依存して形態や性質の異なるバイオフィルムを形成すること、*L. dumoffii* の *djlA* は病原遺伝子であること、臨床検査としては尿中抗原の検出が最も有効であること、検査機関には DNA hybridization の導入を勧めなければならないことが分かり、レジオネラ属、*L. pneumophila* の血清型を鑑別・同定するための遺伝学的検査法の開発を行うことができた。今後さらにレジオネラの生態や病原因子を解明する研究と、多様なレジオネラ種、血清型に対応できる尿

中抗原検査法の開発研究が必要と考える。

F. 健康危機情報

「該当なし」

G. 研究発表

「レジオネラ属菌によるバイオフィルム形成能の研究」

「レジオネラ属菌に対する熱殺菌効果」

「レジオネラ肺炎原因菌とポンティアック熱原因菌の比較研究」

「*Legionella dumoffii* の DjlA タンパク (DnaJ タンパクファミリーの一つ) は細胞内増殖に必要である」

「*Legionella pneumophila* の *Acanthamoeba* 内増殖を調べる定性検査法 (アメーバ寒天法) の開発」

「レジオネラ症に関する基礎的研究—土壌由来レジオネラ属菌のアメーバ内増殖性と薬剤感受性の検討—」

“Use of the *dnaJ* gene for the detection and identification of all *Legionella pneumophila* serogroups and description of the primers used to detect 16S rRNA gene sequences of major members of the genus *Legionella*.”

“Detection and identification of *Legionella pneumophila* by PCR-restriction fragment polymorphism analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*)”

“Application of RNA polymerase  $\beta$ -subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species.”

「レジオネラ属菌検査方法精度管理」

「日向サンパーク温泉お舟出の湯を感染源とするレジオネラ症集団発生への対応」

「臨床検査によるレジオネラ検出陽性率に関する調査研究」

「レジオネラの細菌学的検査における検体の濃縮法と選択培地の比較研究」

「福利厚生のための入浴施設におけるレジオネラ症防止対策—安全で快適な心の湯浴みのために—」

「レジオネラ感染」

「レジオネラ属」

H. 知的財産権の出願・登録状況

「該当なし」

## II. 研究の成果

### 1. レジオネラの生態に関する研究



〔目的〕レジオネラ属細菌による感染症は、在郷軍人病とポンティアック熱が知られている。感染経路は、汚染された水がエアロゾル化され、それが肺に吸入される空気感染である。汚染された水が原因で感染を起こしたという事例はよく知られているが、ヒトからヒトに伝染した、という報告は現時点ではまだ報告されていない。従って、レジオネラの感染予防対策を立てるには、環境中のレジオネラの生態を知ることが重要になってくる。

レジオネラは自然界では水と土壌に栖息しているが、人工的な水環境、例えば冷却塔、給湯設備等にも生存しており、それらの環境が感染源になりうる。レジオネラ属菌が水環境の中で生活している様式としては、水中を泳いでいるプランクトニック様式のほかに、アメーバの中で増殖する様式とバイオフィームに宿る様式でいることが多いと知られている。レジオネラが他種の菌と同じバイオフィームに共存しているという報告はあるが、レジオネラ自らがバイオフィームを形成するかどうかについては報告がない。われわれは、レジオネラのバイオフィーム形成能について考察を始めた。

〔実験方法〕レジオネラ属36種、総計50株の菌のバイオフィーム形成能をしらべた。25℃、37℃、42℃で Buffered yeast extract (BYE)液体培地にて静止培養を行い、ガラス製の試験管の壁面にバイオフィームが形成されているかを、1カ月に渡って観察した。その結果、この条件でバイオフィームを形成するレジオネラ属菌が存在している事が明らかとなった。レジオネラのバイオフィームは、空気と培地との界面あたりの壁面に形成され、培地の表面にはほとんど形成されなかった。観察中期間中に肉眼で観られるこのバイオフィームの幅を基準に記録した(図1)。

図1 方法

## レジオネラ属細菌の バイオフィーム形成能は如何か？

総計36種 50株のレジオネラ属菌を検討

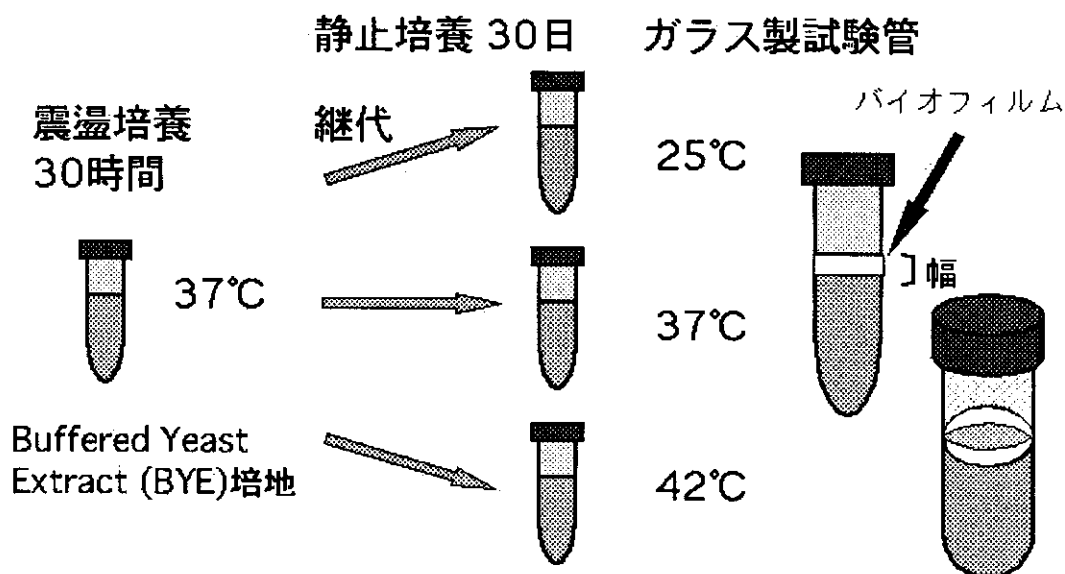


表1に示されている++は2ミリ以上の幅のバイオフィーム形成、+はそれ以下のバイオフィーム形成、そして+/-は微妙に膜らしい構造は見えるが振ると崩るといふ場合を指している。-の場合は、これらの温度では増殖できるのにも関わらず、バイオフィームの形成を示さなかった場合である。

表1 レジオネラ属細菌のバイオフィルム形成能

レジオネラ属菌	25℃	37℃	42℃
<i>L. pneumophila</i> , 血清群 1-11 (13株)	+	++	++
<i>L. saintelensis</i> (1株)	+	-	-
<i>L. bozemanii</i> , <i>L. jamestowniensis</i> , <i>L. londiniensis</i> , <i>L. worsleiensis</i>	-	+/-	+/-
<i>L. lansingensis</i> , <i>L. moravica</i> , <i>L. cincinnatiensis</i> , <i>L. tusconensis</i> , <i>L. parisiensis</i>	+/-	+/-	-
<i>L. dumoffii</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. feeleii</i> , <i>L. rubrilucens</i> , <i>L. israelensis</i> , <i>L. hackeliae</i> , <i>L. quinlivanii</i> , <i>L. brunensis</i>	-	+/-	-
<i>L. fairlandfieldensis</i> , <i>L. geestiana</i>	+/-	-	-
<i>L. micdadei</i> , <i>L. dumoffii</i> , <i>L. oakridgensis</i> , <i>L. wadsworthii</i> , <i>L. feeleii</i> , <i>L. hackeliae</i> , <i>L. maceachemii</i> , <i>L. spiritensis</i> , <i>L. santicrucis</i> , <i>L. erythra</i> , <i>L. birminghamensis</i> , <i>L. anisa</i> , <i>L. jordani</i> , <i>L. adelaidensis</i> , <i>L. gratiana</i>	-	-	-

表2

*L. pneumophila* のバイオフィルム形成速度と付着安定性

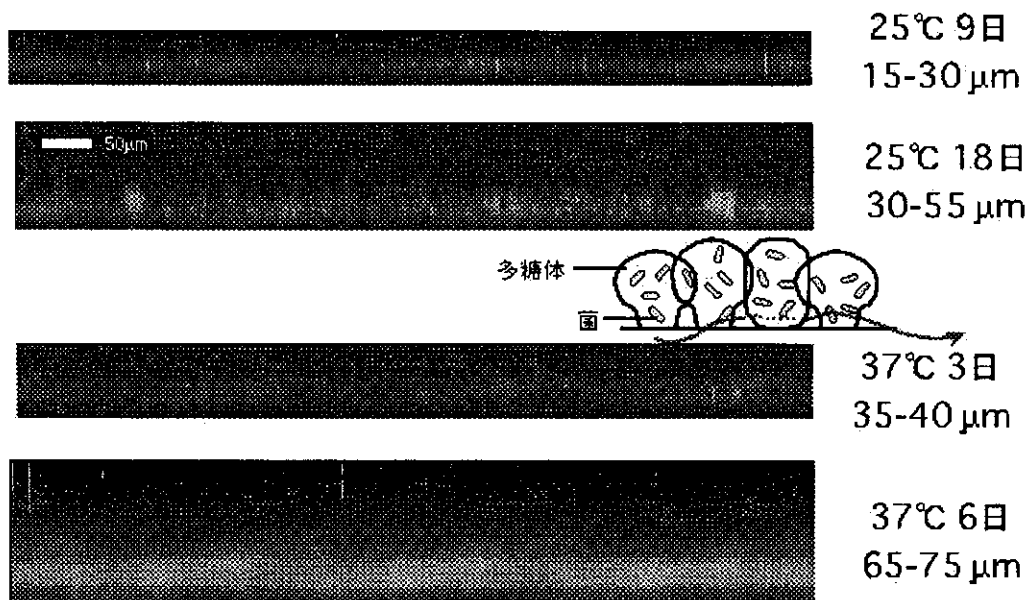
<i>L. pneumophila</i> 種菌 (血清群)	遅 高安定性		速 低安定性			
	25℃		37℃		42℃	
	形成日	離壁日	形成日	離壁日	形成日	離壁日
Philadelphia-1 (1)	12-14	-	2-4	5-8	3-4	5-7
Knoxville-1 (1)	11-15	-	2-4	6-8	2-4	4-7
Togus-1 (2)	12-15	-	2-3	5-8	3-4	4-7
Bloomington-1 (3)	10-12	-	3-5	6-8	2-4	3-5
Los Angeles-1 (4)	12-15	-	2-4	5-7	2-4	4-5
Dallas-1E (5)	11-14	-	2-4	4-8	2-5	4-7
Chicago-2 (6)	11-12	-	3-5	5-8	2-5	5-7
Chicago-8 (7)	12-14	-	2-4	7-9	3-5	5-9
Concord-3 (8)	10-15	-	3-4	6-8	2-4	5-7
ATCC 35289 (9)	12-14	-	3-4	5-10	2-6	3-8
Leiden-1 (10)	9-14	-	2-4	5-8	2-4	5-10
ATCC 43130 (11)	11-14	-	3-4	5-9	3-4	5-7
ATCC 33737 (?)	12-14	-	2-4	6-10	3-6	5-8

〔結果および考察〕表1に示すように *Legionella pneumophila* 種全13株は、他の種のレジオネラより明らかに高いバイオフィーム形成能を有していた。この属の中で、人から分離されることの最も多い *Legionella pneumophila* 種が、バイオフィーム形成能も最も高いということは、非常に興味深い。この形成能に関わる生存メカニズムによって *L. pneumophila* は人工的な水環境中でもうまく生存し、結果的に感染率が高いという現象に至ったとも考えられる。

表1に示したように *L. pneumophila* は、37℃や42℃で培養された場合、25℃のよりも幅が広めのバイオフィームを形成した。次に、肉眼で観察できるバイオフィームを形成するのにかかった時間を比較した(表2)。37℃や42℃の場合、平均3日程で観察されるのと比較して、25℃の場合、平均13日程が必要であった。表2の中の「離壁日」というのは、バイオフィームが試験管の壁面から剥がれ落ちた日を示しており、付着安定性の目安となる。平均5、6日までしか維持出来ない37℃や42℃のバイオフィームと対照的に、25℃のバイオフィームは観察期間内では剥がれる事はなかった。つまり、37℃や42℃では、バイオフィームは比較的速く形成されますが、付着安定性が低いという結果であった。それに対し、25℃の場合、形成速度は遅いが、付着安定性は高かった。

以上の観察は肉眼で行われたものであるが、バイオフィームの厚みに関しては、肉眼の観察でも37℃や42℃で形成されるバイオフィームの厚さは25℃で形成されるそれよりも厚いという印象があった。そこで、実際の厚みを計測することを試みた。*L. pneumophila* に green fluorescent protein (GFP、緑色蛍光タンパク)を発現させ、共焦点蛍光顕微鏡でバイオフィームの断面を比較した(図2)。

図2 共焦点蛍光顕微鏡で観られる *L. pneumophila* のバイオフィーム (断面図)



25℃、9日目では肉眼でまだはっきりバイオフィームがあるとはいえない時期であるが、共焦点蛍光顕微鏡を用いた計測では、約15—30μmの厚さがあった。25℃、18日目の成熟したバイオフィームは30—55μmの厚みがあった。一方、37℃のバイオフィームは、形成速度が速いため、3日目ですでにバイオフィームが観察され、その厚みは35—55μm程度であった。6日目のバイオフィームは肉眼では明らかに厚みが増している、随時試験管の壁面から剥がれ落ちてしまいそうな状態であるが、顕微鏡で観察すると約65—75μmであり、25℃の成熟したバイオフィームよりは、明らかに厚くなっていた。ここで注目されるのは、25℃のバイオフィームは、この断面図で示されるように、集中的に菌が多い部分と、隙間らしき部分が織り混じっている構造を示していることである。これは、緑膿菌や大腸菌など多くの菌が形成するバイオフィームでもよく観られる構造であり、マトリックスである多糖体が芽や柱の形に構築され、その間に栄養素や廃棄物が通りやすいように隙間が空けられているという構造になっている。*L. pneumophila* が25℃で形成するバイオフィームもそのような

構造をしていると考えられる。一方、37℃では、そのような構造は認められず、6日目の段階では、菌の密度が極めて高くなっているため、むしろ均一に見えた。立体図を見ると(図3)、25℃で輝度の高い部分が、前述の茸や柱型の構造にあたるが、37℃の場合は、まんべんなく蛍光が発されていて、この手法では、これ以上の詳細な観察ができないが、37℃では明らかに通常認められているバイオフィルムの構造とは異なっていることがわかった。

図3 共焦点蛍光顕微鏡で観られる *L. pneumophila* のバイオフィilm (立体図)

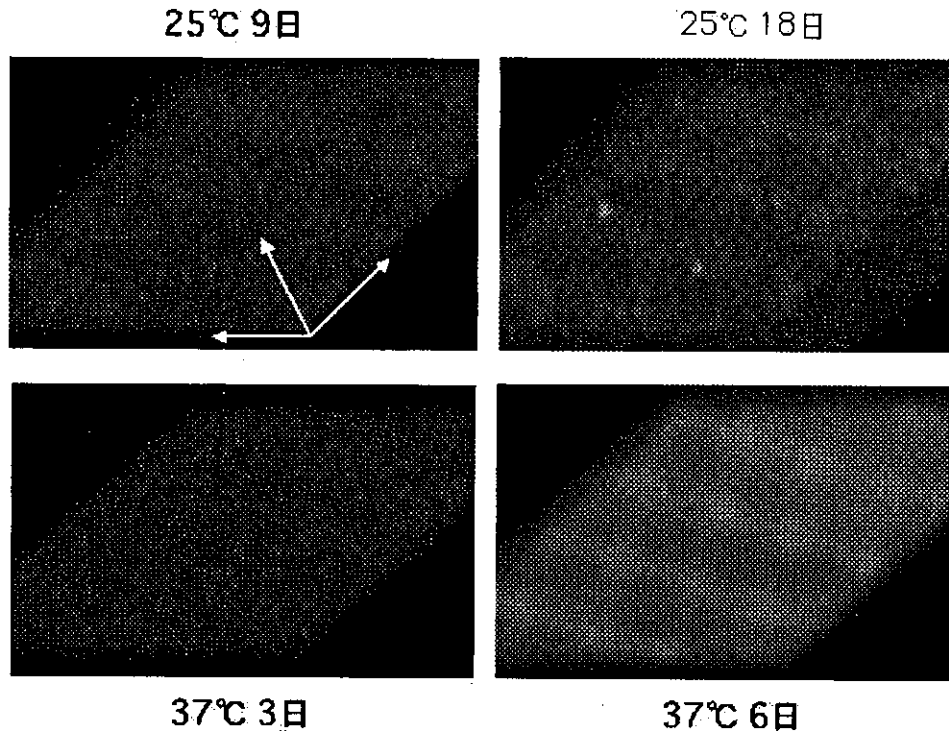


図4 走査顕微鏡で観られる *L. pneumophila* バイオフィilm (37℃、42℃)

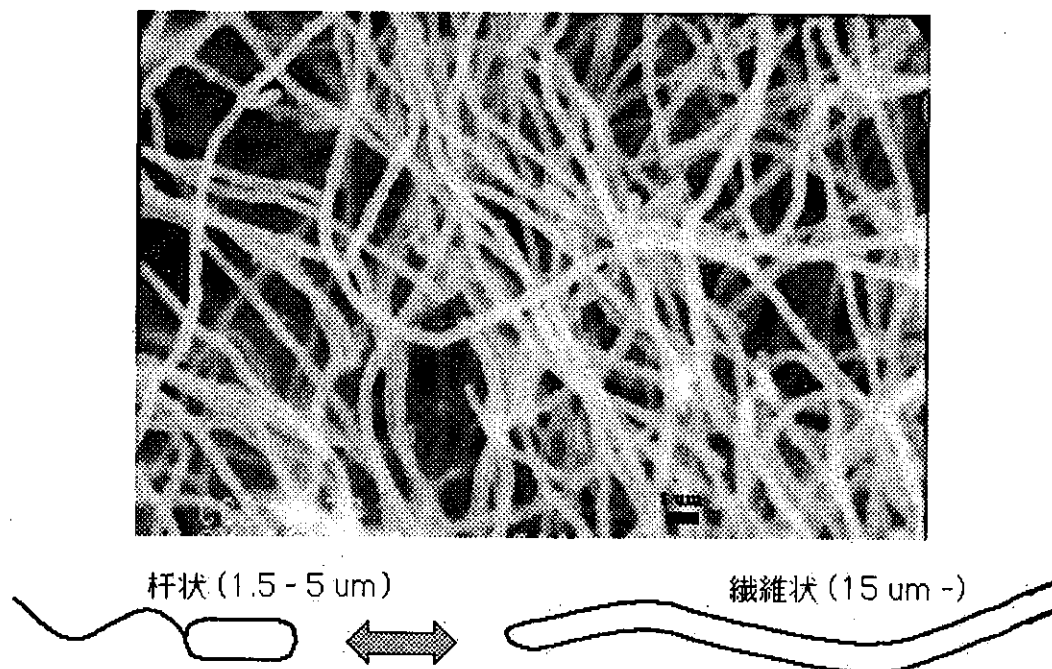




図 6

バイオフィルムに宿る *L. pneumophila* 菌の形態は  
培養温度によって異なる

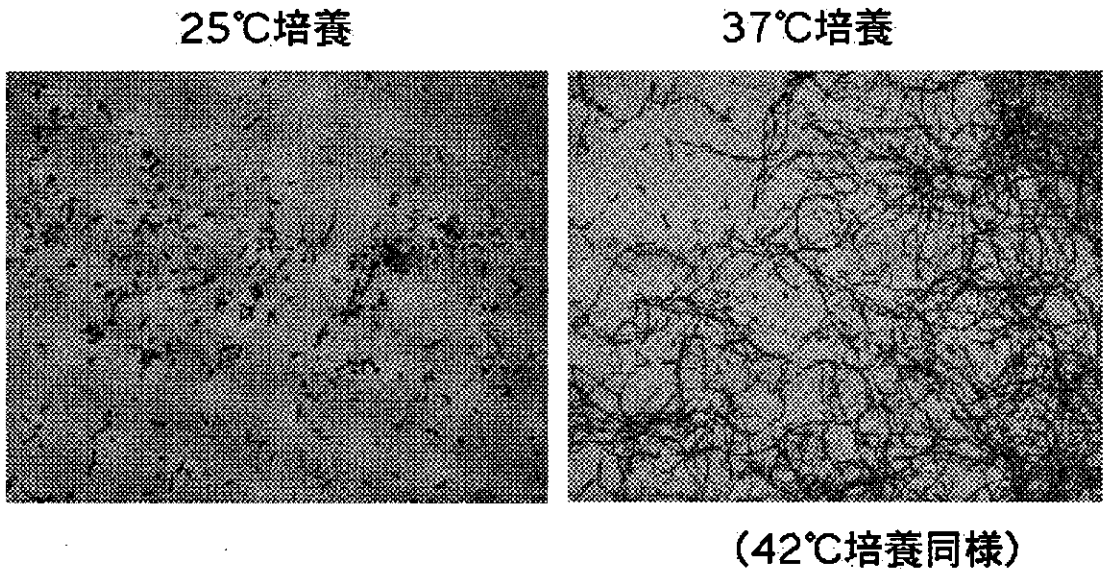
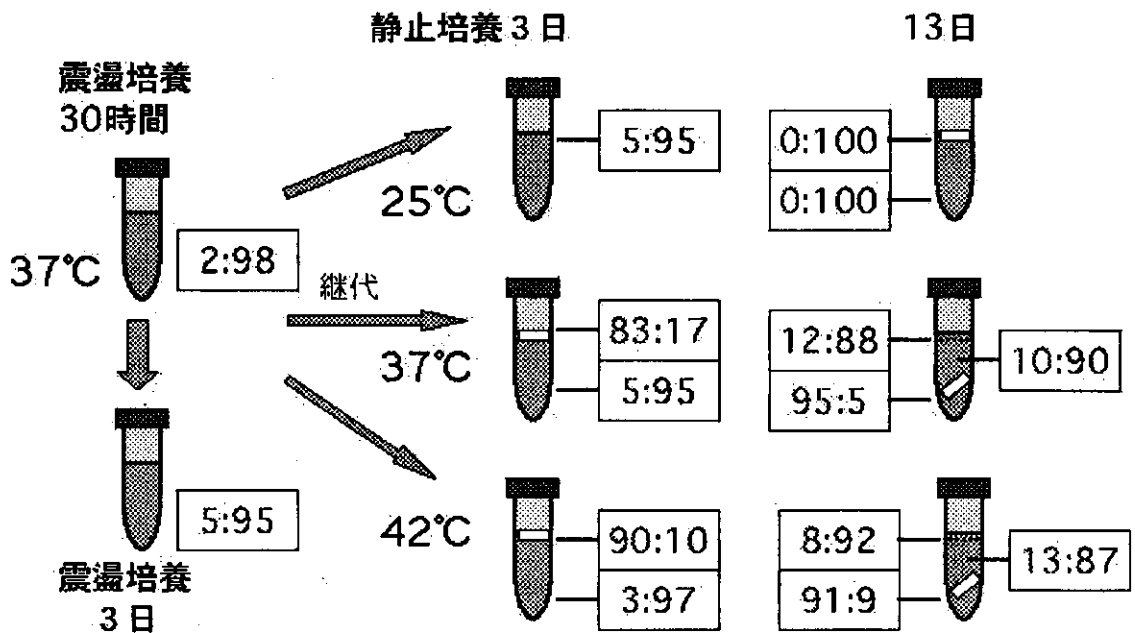


図 7

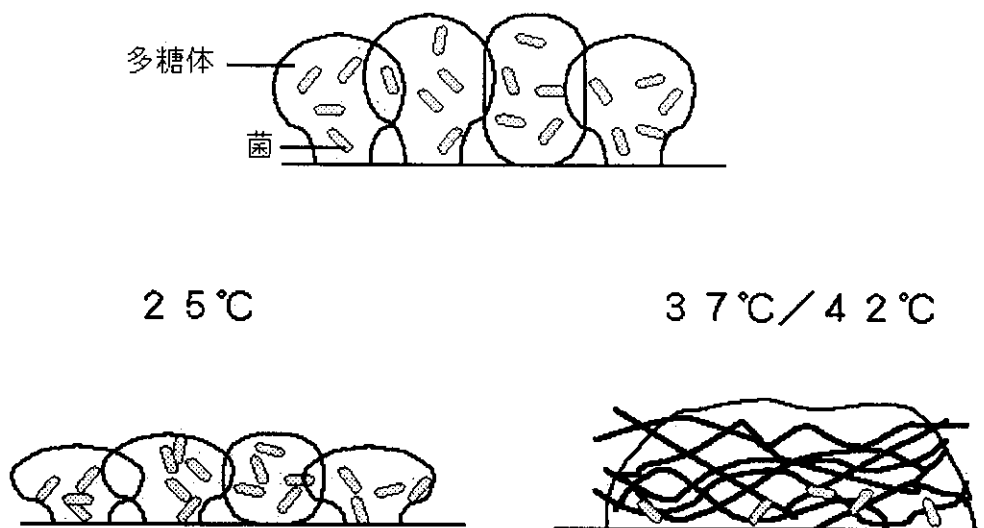
バイオフィルムに宿る *L. pneumophila* 菌の形態

繊維状 vs 杆状の比率



〔まとめ〕レジオネラ属菌の中では、*L. pneumophila* 種が最も高いバイオフィーム形成能を有していた。そのバイオフィームの厚み、形成速度及び付着安定性は、温度に調節されていた。さらに、バイオフィームに宿る菌の形態も温度に調節されていた。25℃は自然環境でも出会える温度ですが、37℃や42℃は、温泉や浴槽等人工的な施設で菌が会う温度である。その時、速く、厚くバイオフィームを形成出来るという性質は、高温環境で生き続ける *L. pneumophila* の生存メカニズムと関わりがある、と考えられる。今後、この温度調節に基づく遺伝子の発現と調節を検討して行くことが課題となる。

図 8



## レジオネラ属菌に対する熱殺菌効果

九州大学大学院医学研究院細菌学分野

史君綽、朴貞玉、Oksana Barysheva, 吉田眞一

### 研究目的

環境中に存在するレジオネラ属菌の代表的な増殖形式に対し熱殺菌を行い、効果を検討する。

### 基本条件

(1) レジオネラ属菌の増殖形式：

プランクトニック（単独浮遊菌体）

バイオフィルム中

アメーバ中

(2) 試験株：

レジオネラ - *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 株

アメーバ - *Acanthamoeba cubertsoni* 株

(3) 培地：

Buffered Yeast Extract (BYE) 液体培地（レジオネラ用）

Buffered Yeast Extract Charcoal Agar (BYECA) 寒天培地（レジオネラ用）

Peptone Yeast Extract Glucose *Acanthamoeba castellanii* (PYGAC)液体培地  
（アメーバ用）

(4) 菌数測定：段階希釈前／段階希釈後の菌液を BYECA に巻き、3～4日  
37℃培養後、CFU を定量。

### 第一段階検討条件

(1) 殺菌温度：60、65、70、75、80℃

(2) 殺菌時間：1、3、5分

(3) 培養条件：

I. プランクトニック（単独浮遊菌体）

37℃にて24時間震盪培養。

II. バイオフィルム中



図1：各増殖形式のレジオネラ菌はこれらの状態で加熱される。

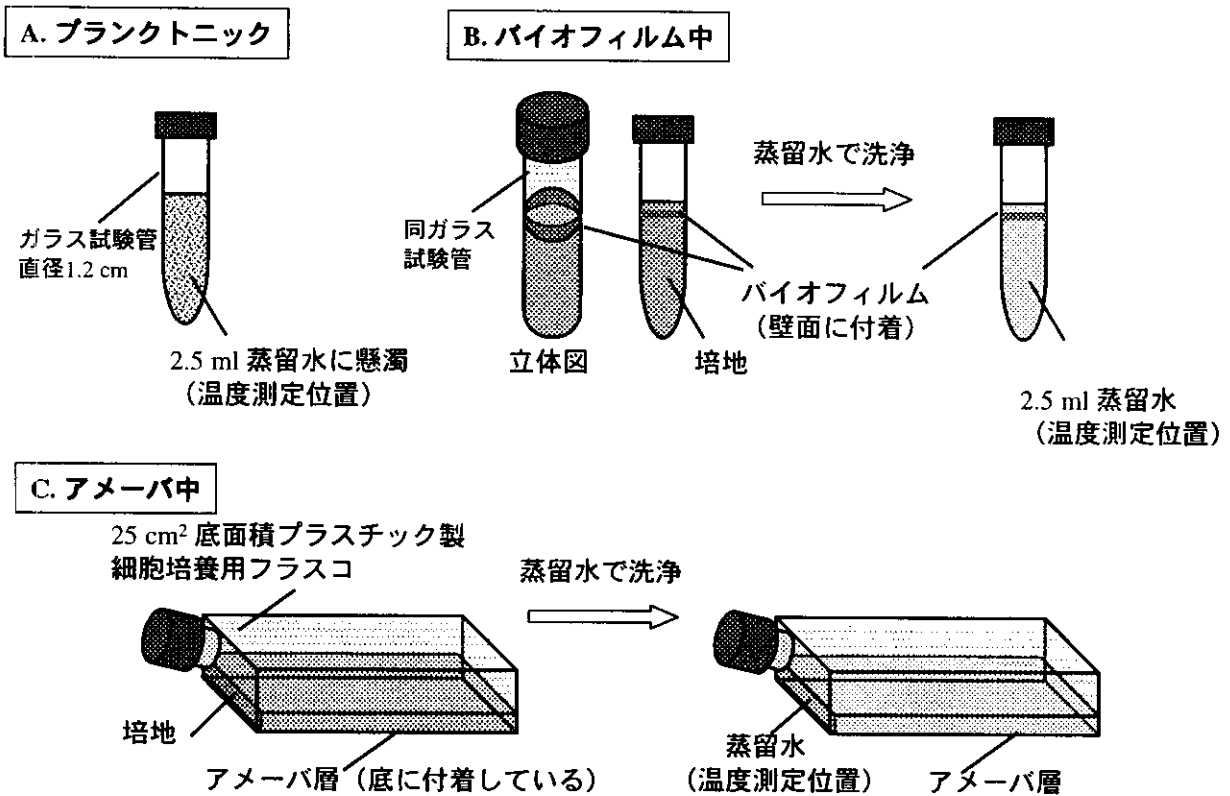
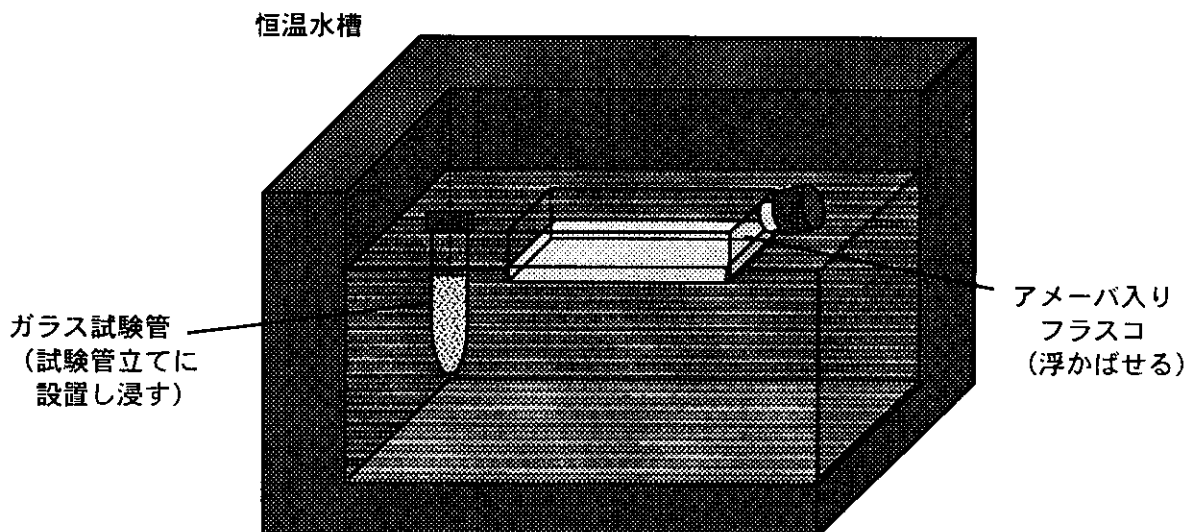
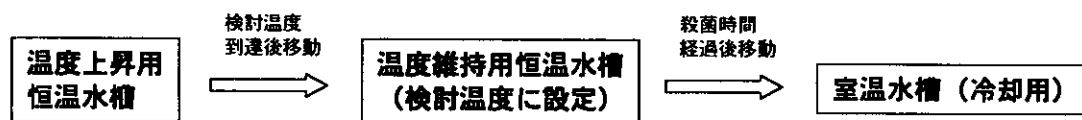


図2：加熱状況



25℃にて18日間静止培養（バイオフィルム形成）。

（参考図1B参照）

### III. アメーバ中

フラスコ内 $10^7 \sim 10^8$ アメーバに $10^8 \sim 10^9$ レジオネラ加入後、  
37℃にて48時間培養。（参考図1C参照）

#### （4）加熱前の処理：

##### I. プランクトニック（単独浮遊菌体）

蒸留水で希釈（ $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml）。（参考図1A参照）

##### II. バイオフィルム中

培地を除去後蒸留水で洗浄。

付着しているバイオフィルム（ $10^6 \sim 10^8$ CFU）のみ残留。

（参考図1B参照）

##### III. アメーバ中

アメーバ外のレジオネラを蒸留水で洗浄除去。

アメーバ及びアメーバ内レジオネラ（ $10^6 \sim 10^8$ CFU）のみ残留。

（参考図1C参照）

#### （5）加熱過程：

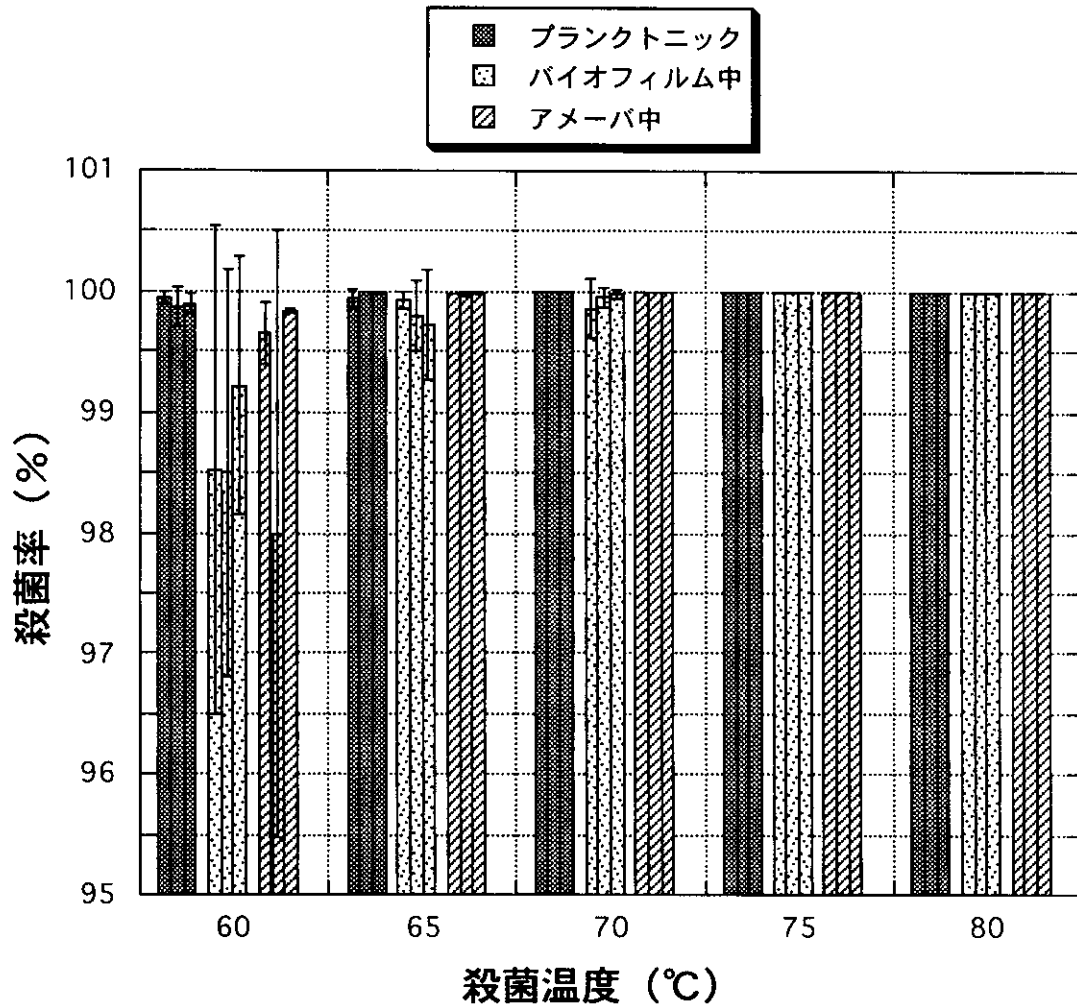
温度上昇用恒温水槽にて検討温度まで（約5～12分、検討温度による）加熱後、温度維持用恒温水槽に移動。指定時間（殺菌時間）経過後、室温水槽にて即冷却。（参考図2参照）

### **第一段階結果**

プランクトニック形式及びバイオフィルム形式のレジオネラに対し3度の検討を行い、アメーバ形式に対しては、2度行った。

（生データは参考データ1を参照）

図 1 : 各増殖形式に対する平均熱殺菌効果  
(殺菌時間 1 分、3 分、5 分)



**考察**

- (1) 殺菌時間依存性は無いと見える。
- (2) 60℃、65℃では、各増殖形式の殺菌が不完全である。
- (3) プランクトニック形式及びアメーバ中のレジオネラは、70℃で完全殺菌を示したが、バイオフィルム中のレジオネラは、3回のうち1回は不完全殺菌であった (参考データ1を参照)。しかしながら、この差は統計学的処理を行った後、「有意差では無い」と認められた (参考データ2を参照)。

(4) 75℃、80℃では、各増殖形式の殺菌が完全である。

### **第一段階結論**

(1) 製品の安全性の観点から見ると、60℃、65℃での殺菌は不完全なため、妥当では無い。

(2) 70℃殺菌は、バイオフィルムの場合、1回「不完全」というデータがあるため、再検討が必要である。

(3) 18日間静止培養で形成されたバイオフィルムを用いているが、この条件で形成されたバイオフィルムの熱耐性が最も高いか、が疑問に思える。

(4) 製品の殺菌温度は70～75℃の範囲が妥当だと推測される。

(5) 殺菌時間依存性が無いと見えるため、1分以下の殺菌時間でも効果が認められると推測される。殺菌時間を30秒程度に短縮できるのが望ましい。

### **第二段階検討条件**

第一段階検討から得た結論を基に、以下の追加検討を行った。

(1) 熱殺菌に対し最も耐性が高い状態のバイオフィルムを見い出すため、レジオネラを25℃で静止培養し、12日、15日、18日、21日、24日、27日にてバイオフィルムを採集。それらを対象に70℃で10秒、30秒、1分の加熱効果を2度検討。

(2) (1)の検討結果に基づき、妥当なバイオフィルムを形成させ、(3)の検討に使用。

(3) 各増殖形式を以下の条件で熱殺菌効果を3度検討。

70℃、72℃、75℃

10秒、30秒、1分、3分

註：基本条件及び熱殺菌検討手法は、第一段階と同様。

### **第二段階結果**

#### **I. バイオフィルム培養条件の検討**

熱殺菌に対し最も耐性が高い状態のバイオフィルムを見い出すため検討したところ、以下の結果を得た。