

20031395

厚生労働科学研究費補助金
がん予防等健康科学総合研究事業

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15年度
総括・分担研究報告書

主任研究者 吉田 真一

平成16(2004)年3月

厚生労働科学研究費補助金
がん予防等健康科学総合研究事業

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15年度
総括・分担研究報告書

主任研究者 吉田 真一

平成16(2004)年3月

目次

I. 総括研究報告書

- 生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究 1
吉田真一

II. 分担研究報告書

1. 環境中のレジオネラ汚染実態の調査・研究 11
古畑勝則
2. 染色体 DNA の接合伝達による *Legionella pneumophila* の病原変換に関する研究 17
宮本比呂志
3. *Legionella pneumophila* のストレス蛋白発現と宿主細胞内増殖性との相関に関する研究 21
三宅正紀
4. レジオネラ属菌種の網羅的感染症診断のための遺伝子検査法と抗体検査方法の研究開発 30
江崎孝行
5. 鹿児島県東郷町の循環式浴槽を感染源とするレジオネラ症集団発生への対応 35
藪内英子、縣邦雄
6. レジオネラ肺炎診療の現状に関する研究—レジオネラ尿中抗原検査法の有用性について 43
田口善夫

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 47

IV. 研究成果の刊行物・別刷 49

I. 総括研究報告書

生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究

吉田真一

生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究

主任研究者名 吉田 真一 九州大学大学院医学研究院細菌学分野

研究要旨

レジオネラ属菌は淡水に生息し、主に細菌捕食性原虫の中で増殖する病原細菌である。生活環境中の水利用施設では特に循環濾過式浴槽、クーラーの冷却塔水、修景水などの中で増殖して感染源となり、エアロゾルの発生によりヒトに空気感染を起こす。吸入されたレジオネラはヒトのマクロファージや上皮細胞で増殖し肺炎とポンティアック熱を引き起こす。本研究班は、レジオネラによる環境汚染の実態を把握し、環境中での生息の仕方（生態）とヒトへの病原性を明らかにし、環境中と臨床検体から迅速にレジオネラを検出、同定する方法を開発して予防と治療に役立て、レジオネラ症の臨床的現状を明らかにすることを目的として組まれた。平成 15 年度は個々の目的について以下のことを明らかにした。生態では全国の温泉を調査し、汚染率が 28.7%であることを示し、分離菌の薬剤感受性とパルスフィールドによる解析を行った。さらに *Legionella pneumophila* がバイオフィルムを形成し、温度により菌の形態に違いが出るという興味深い現象を見つけた。病原性については接合によって病原変換が起こることを世界で初めて示し、レジオネラのストレス応答がアメーバとマクロファージの中では異なること、*L. dumoffii* の *DjlA* 遺伝子が細胞内増殖に必須であることを実験により明らかとした。迅速診断法の開発では *DnaJ* 遺伝子を利用することによってレジオネラ属菌種と、*L. pneumophila* 15 血清群が鑑別診断できることを見出して発表し、網羅的な迅速診断法開発への道を開いた。循環濾過式浴場を感染源とした集団レジオネラ感染が発生した東郷町（鹿児島県）、日向市（宮崎県）に赴き、原因調査、再発防止対策を講じた。臨床的にはレジオネラ感染症診断への尿中抗原検出キットの有効性を明らかにした。

分担研究者

藪内英子（岐阜大学医学部非常勤講師）

江崎孝行（岐阜大学医学部微生物・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）

古畑勝則（麻布大学環境保健学部）

田口善夫（天理よろづ相談所病院呼吸器内科）

三宅正紀（静岡県立大学薬学部微生物学）

研究協力者：

飯田健一郎、史君緯、大西裕子、朴貞玉、Oksana Barysheva

(九州大学大学院医学研究院)

入江正洋 (九州大学健康科学センター)

河村好章 (岐阜大学医学部微生物・バイオインフォマティクス)

縣 邦雄 (アクアス株式会社つくば総合研究所)

馬庭 厚 (天理よろづ相談所病院呼吸器内科)

権平文夫 (デンカ生研)

A. 研究目的

生活環境におけるレジオネラ感染を予防するために、環境水中のレジオネラ汚染の実態を把握し、菌の生態についての理解を深めること、菌側の病原因子と生体側の防御因子を明らかにすること、環境診断と臨床診断の両方が迅速で正確にできるレジオネラ診断法の開発研究を行うこと、レジオネラ集団感染事例をレビューし問題点をさぐり、予防への提言を行うこと、レジオネラ症の診断・治療の基準作りを行うこと、を具体的な研究の目的としている。

近年はとくに循環濾過式浴場でのレジオネラ症集団発生が起り死者も出たため、とかく注意が循環濾過式浴場に向いているが、レジオネラ感染の危険性があるのは循環濾過式浴場だけではない。これまでと同様、クーラーの冷却塔水、修景水は細菌学的な管理を怠るといつでもレジオネラ感染の危険がある。さらに雑用水の使用適用範囲が広められ、車の洗車や、庭園の散水などエアロゾルが多量に発生する用途に使われることになった。これに対してもレジオネラ感染予防のための管理を徹底しなければならない。

レジオネラ感染症は四類感染症に分類され全例報告が義務づけられることとなり、診断の精度向上がますます求められている。本研究では診断には尿中抗原検査が最も有効であることを明らかにした。本年度は1. レジオネラの生態に関する研究、2. レジオネラの病原性に関する研究、3. 迅速診断法の開発、4. レジオネラ症集団発生への対応、5. レジオネラ感染に対する生体の反応に関する研究、6. レジオネラ症の臨床疫学的調査研究、と6つの基本課題を据えて、生活環境におけるレジオネラ感染の予防のための方策を確立することを目的として研究した。

B. 研究方法

1. レジオネラの生態に関する研究

環境中に生息するレジオネラの生息状況・分布・生態を知ることが感染予防の第一歩である。レジオネラの菌種、血清群のみならず、最も分離頻度の高い *Legionella pneumophila* については血清群のみならず分子遺伝学的手法を用いた型別も必要となってくる。さらにそれら環境中から分離される菌種の病原性や薬剤感受性を知る必要がある。

一方、これまでの研究で *L. pneumophila* が環境中でバイオフィルムを形成することが明らかとなり、温度によってその性質やバクテリアの形態が異なることを示してきた。この現象を遺伝学的に明らかにする研究を行った。

身近な環境中に生息するレジオネラに対して有効な消毒剤または抗菌物質を探索することも課題となる。循環風呂や修景水については様々なものが報告されているが、いまだに塩素に頼っているのが現状である。一方、冷却塔水ではブロム系の消毒剤も使われている。できるだけ日常生活に支障をきたさず、不快感をもたらさない殺菌剤の開発が急がれる。

2. レジオネラの病原性に関する研究

レジオネラ属菌は環境中ではアメーバなどの細菌捕食生原虫の中で増殖する。生体に感染後はマクロファージや呼吸器上皮細胞の中で増殖し肺炎を起こす。このように細胞内増殖能力を有することがレジオネラの病原性の最も重要な部分である。本年度は *L. pneumophila* の病原遺伝子の接合による伝達、ストレスタンパクの発現、*L. dumoffii* の細胞内増殖に必要な遺伝子についての研究を行った。

3. 迅速診断の開発

環境中に生息するレジオネラの菌種・血清群とその数を迅速にしかも安価に検査できる方法を開発することが感染源対策に必要となってくる。一方、臨床においても起炎菌の迅速同定検査が求められている。

4. レジオネラ症集団発生への対応

レジオネラ集団発生の現場に赴き、原因の調査、患者の発生の状況、対策を実施することは今後のレジオネラ発生を予防するために多くの教訓を得ることができる。今年は平成 14 年に起こった日向市での集団感染についての調査結果を報告する。

5. レジオネラ感染に対する生体の反応に関する研究

発病歴はないのにレジオネラ抗体価が上昇している人は多く、その人達は不顕性感染になっていると考えられる。知らず知らずのうちにレジオネラに曝露されているのである。家庭用の 24 時間風呂の使用者はレジオネラ感染症の発病は有意に多くはないが、抗体保有率が高いことを示してきた。今回それら抗体保有者が 24 時間風呂の使用をやめた場合、抗体価が 3 年後にどのような変化を示すかを調査した。

6. レジオネラ症の臨床疫学的調査研究

1992 年に出された「厚生省レジオネラ肺炎診断基準と診断・検査及び治療指針」の改訂のためにレジオネラ症の症例検討、治療法、診断法の選択などについて調査研究を行った。

(倫理面への配慮)

レジオネラ感染症の実態を把握するための病院および臨床検査施設へのアンケート調査にあたってはプライバシーの侵害をしないよう患者名をあげることはしない。動物実験は、「動物の愛護および管理に関する法律」(昭和48年)、「大学における動物実験について(通知)」(昭和62年文学情第141)等、および各研究機関の動物実験倫理指針に基づき、動物愛護の観点から動物に苦痛を与えないように実施する。

C. 結果結果と D. 考察

1. レジオネラの生態に関する研究

1) 全国の温泉のレジオネラ生息状況

43 都道府県で採取した温泉水 656 試料について培養法によってレジオネラ属菌の検出を試みた。レ

ジオネラは 656 試料中 188 試料 (28.7%) から検出され、全国各地に生息していることが判明した。また、分離された菌種はほとんどが *L.pneumophila* であり、中でも血清群 1 群および 5 群が多く分離される傾向があった。これらの菌株について薬剤感受性などの特性を明らかにするとともに、遺伝子生物学的な検討を行い、地域的差異について考察した。

この調査によりレジオネラ属菌の生態学的特徴を把握でき、感染源対策に有用なデータが得られた。温泉水における本菌の情報は非常に少なく、今後改訂される「レジオネラ症防止指針」にも追記されることを希望する。

2) 温泉水から分離されたレジオネラの薬剤感受性試験

レジオネラ症に関する疫学的研究の一環として、2003 年に全国各地の温泉浴槽水から分離された *L.pneumophila* 124 株について Etest により 10 薬剤に対する薬剤感受性を検討した。その結果、供試薬剤のうち抗結核剤である rifampicin の MIC₉₀ が 0.125 μg/ml と最も優れた抗菌力を示した。次に、levofloxacin と imipenem が 4 倍差の 0.5 μg/ml, azithromycin と sparfloxacin が 8 倍差の 1 μg/ml, erythromycin, clarithromycin および gentamicin が 16 倍差の 2 μg/ml であった。ところが、minocycline は 16 μg/ml, piperacillin は >256 μg/ml と高値を示し、それぞれ 128 倍および 4,096 倍、rifampicin より劣っていた。

以上のように、温泉浴槽水由来株の薬剤感受性は、臨床分離株や土壌由来株のそれと比較してやや低い傾向が認められた。

3) パルスフィールドゲル電気泳動による分子疫学的調査

本菌の疫学的調査は、主に血清学的手法によって行われているのが実状である。しかし近年、分子疫学的な手法の一つであるパルスフィールドゲル電気泳動(Pulsed-Field Gel Electrophoresis : PFGE)を用いて DNA 断片の泳動パターンを解析することが菌株間の類似性を知るために有用であることが報告されている。そこで、*L. pneumophila* の疫学的な基礎的検討として、東京都内で分離された *L. pneumophila* 1 群の臨床由来株と環境由来株について、PFGE により株間の類似性について検討を行った。その結果、同一血清群の *L.pneumophila* であっても PFGE 泳動パターンは多岐に渡ることが判明した。臨床由来、冷却塔水由来、浴槽水由来、土壌由来および水景用水由来において、各由来ごとの明確な同一パターンは認められず、多様な泳動パターンを示すことが明らかになった。

4) レジオネラに有効な殺菌物質の探索

グレープフルーツの種子の抽出物がレジオネラに対して増殖抑制作用および殺菌作用を持っていることを示した。

5) バイオフィーム形成の研究

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。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°C、37°C、42°C 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。37°C のバイオフィームは繊維状の菌が絡んでいるような構造になっていることがわか

った。同じく形成速度が速く、そして厚い 42℃でのバイオフィルムも同様であった。塩酸—ギムザ染色法で菌体の核を染めてみたところ、繊維状に伸長した菌体は多核であることが認められた。一方、25℃でのバイオフィルムの菌は、短桿状の形態であった。つまり、温度差によって、バイオフィルムに宿る菌の形態に相違がある、ということを見出した。

2. レジオネラの病原性に関する研究

1) 接合による病原変換の証明

病原性プラスミドやファージなどによる菌株の病原変換はよく知られた現象であるが *L. pneumophila* では報告されていなかった。*L. pneumophila* 弱毒株が強毒株に変換（病原変換）することを見出したので、その機序を明らかにするため実験を行った。その結果、病原変換の機序は染色体上の病原遺伝子の接合伝達であることを明らかにした (J.Bacteriol. 2003, 6712-6718)。染色体の接合伝達による病原変換はこれまでに報告が無く、*L. pneumophila* で初めて明らかにされた現象である。

2) レジオネラは宿主に対応したストレス応答を行う

L. pneumophila は病原株、非病原株ともに、熱などの *in vitro* 刺激に対して同様なストレス応答を示す。しかし感染細胞内では宿主依存的なストレス応答を示すことを見出した。

病原株は自然環境宿主であるアメーバ内ではストレス応答自体が弱く、感染宿主であるマクロファージ内では様々なストレス誘導タンパクを発現する。一方、非病原株では宿主感染直後より全菌体タンパクの合成阻害が起こることを明らかにした。レジオネラ属菌の宿主依存的なストレス応答、さらに病原株及び非病原株の感染宿主内での挙動の相違に関する分子機構を解明することによって、菌の宿主内増殖のコントロールを可能にすべくその応用基盤を確立することが期待される。

3) *Legionella dumoffii* の細胞内増殖に必要な遺伝子の研究

Legionella dumoffii は在郷軍人病の原因菌の一つである。*L. pneumophila* では、マクロファージ内で増殖できることが病原性において大変重要であることがわかっている。一方 *L. dumoffii* は、マクロファージ内で増殖できることのみ報告されている。我々は、*L. dumoffii* の細胞内増殖機構をさらに深く理解するために、トランスポゾン挿入変異株の中から細胞内増殖できない変異株を分離することを試みた。790 株のトランスポゾン挿入変異株をスクリーニングした結果、我々は 4 株の細胞内増殖できない、または、低下した変異株を得た。4 株の細胞内増殖低下変異株のうち、1 株は、*djIA* 遺伝子 (*dnaJ*-like A 遺伝子) に変異が認められた。*DjIA* タンパクは *DnaJ/Hsp40* タンパクファミリー群の一員である。この変異株はファゴソーム・リソソーム融合阻害ができないことが明らかとなった。この研究は、*DjIA* 遺伝子単独欠損変異株が明確な表現型を示すことを述べた最初の研究成果である。

3. レジオネラの迅速同定、迅速診断に関する研究

1) 遺伝子診断、タンパク診断

Legionella 属の菌種の検出同定を網羅的に行うために、40 種類の菌種を識別する 16S rDNA および *DnaJ* 遺伝子のオリゴ DNA シリコンマイクロアレイを作成した。また簡便に主要な種類の各菌種を PCR で識別するための PCR アレイを作成した。

Legionella 属の菌種に対する抗体値を計測する方法を作成するため、外膜蛋白抗原、及び病原因子 (*dnaj*, *mip*, 58kda *omp*, *flagellin*, *Acid phosphatase*, *dotB*,) を発現ベクターにクローニングした。今後は抗原を大量発現させ、レジオネラ感染症の診断に有効な抗体価を迅速に計測する方法を作成する計画である。

レジオネラ属の菌種を識別する簡便な同定方法が市場になく、菌種レベルの報告が少ない。また血清抗体価は全菌体、及び蛍光抗体をつかったものしか使用されていない。特異的な抗原をつかった簡便な抗体計測の系が市場にないため正確な疫学情報が得られない状況であり、この状況を打開したい。

2) 尿中抗原

現在、2社の尿中抗原検出キットが使用されている。しかし1社のキットは *L. pneumophila* 血清群1による感染しか診断できず、他の1社のキットも *L. pneumophila* 血清群1への特異性は高いものの、他の血清群の感染に対しては感度が低く診断が不確実であるという欠点がある。*L. pneumophila* 血清群1以外の血清群、菌種の診断ができる尿中抗原キットの開発研究を始めた。現在、レジオネラ症患者の尿を集め、レジオネラ抗原の精製を行っている。

4. レジオネラ症集団発生への対応

宮崎県日向市で平成14年に起こったレジオネラ症集団発生の疫学調査を行い、結果を報告するとともに、施設への改善策を指示した(感染症学雑誌 78 (2) : 90-98, 2004)。

5. レジオネラ症に対する生体防御に関する研究

平成12年に家庭用24時間風呂使用者と非使用者のレジオネラ抗体価について調査を行い報告した(J.Occup.Health, 2000 42;205-212)。前回調査より3年経過し、レジオネラ抗体価がその後どのように変動したかの追跡調査を家庭用24時間風呂使用状況に基づき行った。レジオネラ抗体価追跡調査において、家庭用24時間風呂使用をやめた人はレジオネラ抗体価が下がることを明らかにし、家庭用24時間風呂の使用が実際にレジオネラ感染の機会を増やしていることを示した(J.Occup.Health, 2004 46;68-77)。

6. レジオネラ症の臨床疫学的調査研究

天理よろづ相談所病院にて2000年4月から2003年12月までにレジオネラ肺炎を疑いレジオネラ尿中抗原検査を施行した100例(当院の症例67例と近隣の市中病院の症例33例)について後方視的に検討を行った。検査を行った100例中96例は重症肺炎であり、その中でレジオネラ肺炎確定診断例は11例であった。そのうち10例が尿中抗原検査で診断し治療を行っていた。近年日本においてレジオネラ肺炎の報告が増加し疾患の認知度も向上する中で、レジオネラ尿中抗原検査はその利便性と迅速性から、今後さらに必要性が増すものと考えられた。今後更に集計することでレジオネラ肺炎の一般市中病院での診断、治療の現状がまとまる。今回の研究主旨である1992年に作成されたレジオネラ肺炎の診断基準と診断・検査および治療指針の改定に向けて、文献的検討に加えて基礎データとなる。

今後の新規症例については特に保存尿をサンプリングし、更に有用な尿中抗原診断キットの開発に使用する。また最近の諸外国のレジオネラ症の診断、治療の現状やコンセンサスを調査する。

研究員は多菌種のレジオネラが人体に病原性を持つことをこれまで発表してきた。それらを含め今回の研究によりさらにレジオネラ症の現状把握を行い、実地臨床の中で迅速かつ確実に診断し治療を行う基礎を築き上げることが可能となる。

E. 結論

今年度の班研究であらためて全国の「温泉水」のレジオネラ汚染が高率であることが確認された。次年度は循環の有無や循環のお湯の割合、消毒法とレジオネラ生息状況との相関を見る必要がある。

「温泉」には循環の有無、水道水との混合の有無と割合、レジオネラ検査結果と検査機関などを開示させる指導が必要であると考えられ、その実現のためにも、班研究で行っているレジオネラの菌種と菌数の迅速で正確な検査法の開発がますます急務となっている。レジオネラ症の調査では尿中抗原による診断の有効性が確認された。研究班で目標に掲げている *L. pneumophila* だけではなく菌種スペクトルが広い尿中抗原診断キットの開発が重要性を増している。

F. 健康危険情報

「該当なし」

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 藪内英子、縣邦雄：日向市の新設温泉施設を感染源とするレジオネラ症集団発生、感染症雑誌 78 (2)、90-98、2004
2. 吉田真一：レジオネラの基礎研究－病態と病原性、「ウイルス・細菌と感染症がわかる」羊土社、199-124、2004
3. 古畑勝則、宮本比呂志、福山正文：市販園芸用土からのレジオネラ属菌の分離状況および分離株のアメーバ内増殖性と薬剤感受性。環境感染、19：印刷中（2004）
4. 古畑勝則、原 元宣、福山正文：Legionella pneumophila 血清群 1 群のパルスフィールドゲル電気泳動パターン。防菌防黴、32：印刷中（2004）
5. 古畑勝則、原 元宣、福山正文、吉田真一：温泉水由来 Legionella pneumophila の薬剤感受性。防菌防黴、32：印刷中（2004）
6. 古畑勝則、原之宣、福山正文、吉田真一：温泉水由来 Legionella pneumophila の薬剤感受性、防菌防黴（投稿中）
7. Irie M, Miyamoto H, Ikeda M, and Yoshida S. : A3-year follow-up study of anti-Legionella antibodies in users of Japanese 24-hour hot water baths. J. Occup. Health 46:68-77, 2004
8. Furuhata K, Dogasaki C, Hara M, and Fukuyama M. : Inactivation of Legionella pneumophila from whirlpool bath waters by grapefruit (Citrus paradisi) seed extract. Biocontrol Science 8(3):129-132, 2003
9. Miyamoto H, Yoshida S, Taniguchi H, and Shuman HA. : Virulence conversion of Legionella pneumophila by conjugal transfer of chromosomal DNA. J. Bacteriol. 185(22) : 6712-6718, 2003
10. Liu H, Li Y, Huang X, Kawamura Y, and Ezaki T : Use of the dnaJ gene for the detection and identification of all Legionella pneumophila serogroups and description of the primers used to detect 16S rDNA gene sequences of major members of the genus Legionella. Microbiol. Immunol. 47(11) : 859-869, 2003
11. Miyake M, Fukui T, and Imai Y. : Immediate cessation of protein synthesis in

- Legionella pneumophila* avirulent strains at an early stage of infection in macrophages and amoebae. Cell. Microbiology (submitted)
- 1 2. Sze CC, Piao ZY, Takade A, and Yoshida S. : Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilm by *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. (submitted)
 - 1 3. T. Ezaki and Y. Li. Genetic identification and detection of pathogenic microorganisms 日本臨床 2003; 61, (Suppl): 373-378.
 - 1 4. Ying Li, Yoshiaki Kawamura, Nagataoshi Fujiwara, Takashi Naka, Hongsheng Liu, Xinxiang Huang, Kazuo Kobayashi, and Takayuki Ezaki *Chryseobacterium miricola* sp. nov. a novel species isolated from condensation water of space station Mir. Syst. Applied. Microbiol. 26 : 523-528, 2003
 - 1 5. 江崎孝行.2003. 感染症に対する検査法の進歩：遺伝学的検査法. 新世紀の感染症学（下巻）.日本臨床（臨時増刊号）. 373-380.
 - 1 6. 江崎孝行 2003 Real time PCR と系統アレイを用いた微生物相の網羅的解析方法、バイオインフォマティクスがわかる、105-111. 羊土社.
 - 1 7. 江崎孝行、2003. 病原細菌の遺伝子解析.ウイルス・細菌と感染症がわかる. P28-35. 羊土社

2. 学会発表

1. 古畑勝則, 福山正文: 全国各地の温泉水におけるレジオネラ属菌の生息状況. 第 19 回 日本環境感染学会 (2004. 2) 横浜
2. 宮本比呂志: レジオネラのマクロファージ侵入と細胞内動態に関する遺伝子と機能 第 7 7 回 日本細菌学会総会 シンポジウム 4:細菌成分と宿主の分子の interaction, 平成 1 6 年 4 月、大阪
3. 渡邊拓郎、今井康之、三宅正紀:*Legionella pneumophila pm1* 変異株 GB112 の性状解析 第 76 回日本細菌学会総会 (熊本)、抄録 p.316、2003 年 4 月 2 日
4. 福井貴史、今井康之、三宅正紀: *Legionella pneumophila* の熱ショック蛋白質発現と細胞内増殖性との相関について 第 76 回日本細菌学会総会 (熊本)、抄録 p.317、2003 年 4 月 2 日
5. 三宅正紀、福井貴史、辻勉、今井康之: *Legionella pneumophila* のマクロファージ感染におけるアクチン結合蛋白質 p57 との相互作用について. 第 76 回日本細菌学会総会 (熊本)、抄録 p.317、2003 年 4 月 2 日
6. Masaki Miyake, Takashi Fukui, Yasuyuki Imai, Howard A. Shuman : *Legionella pneumophila* intracellular growth and protein expression profile within macrophage and protozoa. American Society for Microbiology 103rd General Meeting (Washington D.C.) Abstracts p.34, May 18-22, 2003
7. Sergey Pampou, Masaki Miyake, Irina Morozova, James Russo, Howard Shuman, Sergey Kalachikov : *Legionella pneumophila* microarrays for expression analysis and

whole-genome comparisons among related species. American Society for Microbiology 103rd General Meeting (Washington D.C.) Abstracts p.204, May 18-22, 2003

8. 三宅正紀、渡辺拓郎、Maëlle Molmeret、今井康之、Yousef Abu Kwaik : *Legionella pneumophila* の細胞内寄生性に関与する新規遺伝子について 第124年会日本薬学会(大阪)、要旨集-3 p.142、2004年3月29日
9. 三宅正紀: レジオネラ属菌の病原メカニズムについて 第25回星薬科大学大学院研究科助手会・大学院自治会公開合同セミナー(星薬科大学) 平成15年4月26日
10. 河村好章: DNA マイクロアレイを使った微生物の解析-検出・同定・発現一. 第77回日本細菌学会総会(ワークショップ: Methods in Microbiology-最先端研究手法の試み). 大阪. 2004.
11. 河村好章: DNA マイクロアレイを使った微生物の検出および発現測定. 平成15年度理研シンポジウム和光. 2003.
12. Yoshiaki Kawamura, Noriko Mishima, and Takayuki Ezaki : Pathogenic bacteria library- GTC (Gifu Type Culture). Frontier Studies and International Networking of Genetic Resources in Pathogenic Microorganisms. Tokyo. 2003.
13. 劉宏生、河村好章、江崎孝行 : *dnaJ* sequence of *Legionella* sp. is a alternative candidate of quantitative DNA hybridization. 第76回日本細菌学会総会. 熊本. 2003.
14. 李穎、河村好章、江崎孝行 : Microarray for rapid diagnosis for bacterial infection. 第76回日本細菌学会総会. 熊本. 2003.
15. 山田博子、江崎孝行 : 病原体および常在菌の遺伝子を網羅的に固定したマイクロアレイを使用した呼吸器感染症の診断法の作製. 第10回日本遺伝子診療学会大会.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

- Dnajを使用した微生物の同定・検出方法に関連した特許出願を準備中

2. 実用新案登録

「該当なし」

3. その他

「該当なし」

II. 分担研究報告書

1. 環境中のレジオネラ汚染実態の調査・研究

古畑勝則

2. 染色体 DNA の接合伝達による *Legionella pneumophila* の病原変換に関する研究

宮本比呂志

3. *Legionella pneumophila* のストレス蛋白発現と宿主細胞内増殖性との相関に関する研究

三宅正紀

4. レジオネラ属菌種の網羅的感染症診断のための遺伝子検査法と抗体検査方法の研究開発

江崎孝行

5. 鹿児島県東郷町の循環式浴槽を感染源とするレジオネラ症集団発生への対応

藪内英子、縣邦雄

6. レジオネラ肺炎診療の現状に関する研究—レジオネラ尿中抗原検査法の有用性について

田口善夫

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

環境中のレジオネラ汚染実態の調査・研究
分担研究者 古畑勝則 麻布大学環境保健学部助教授

A. 研究目的

Legionella pneumophila は呼吸器系の病原細菌であり、レジオネラ肺炎やポンティアック熱を起こすことが知られている。1999年、感染症新法の施行に伴い、*L.pneumophila* は新興感染症の起炎菌として四類感染症に指定され、2002年12月末までに465例のレジオネラ症患者が報告されている。2002年7月には宮崎県で循環式温泉入浴施設の浴槽水を感染源とした集団感染が発生し、本邦では最大規模の事例となった。

Legionella 属菌が土壌などの自然環境下に広く生息していることは周知の事実である。一方で、ビルの冷却塔水や家庭用24時間風呂等の循環式浴槽水あるいは温泉浴槽水など人工環境下からも高頻度に分離されている。著者らは、レジオネラ属菌の生態学的研究の一環として、わが国の温泉水における本菌の生息状況を調査した。その結果、レジオネラ属菌は北は北海道から南は九州、沖縄まで全国各地の温泉水から分離された。

本菌の疫学的調査は、主に血清学的手法によって行われているのが実情である。しかし近年、分子疫学的な手法の一つであるパルスフィールドゲル電気泳動(Pulsed-Field Gel Electrophoresis: PFGE)を用いてDNA断片の泳動パターンを解析することが菌株間の類似性を知るために有用であることが報告されている。

そこで、*L.pneumophila* の疫学的な基礎的検討として、東京都内で分離された *L.pneumophila* 1群の臨床由来株と環境由来株について、PFGEにより株間の類似性について検討を行った。また、温泉水由来株の薬剤感受性を検討し、疫学的な基礎データを得ることを目的とした。

B. 研究方法

1. 供試菌株

1) 都内で分離された臨床および環境由来の *L.pneumophila* 血清群1群39株を用いた。その内訳は臨床分離株3株(CL1~CL3)、冷却塔水分離株25株(CT1~CT25)、浴槽水分離株7株(BW1~BW7)、土壌分離株3株(SL1~SL3)および水景用水分離株1株(DW1)である。

2) 2003年に全国各地の温泉水から分離同定した *L.pneumophila* 124株を用いた。その内訳は *L.pneumophila* 血清群1群17株、3群12株、4群13株、5群12株、6群12株、8群11株、9群11株、10群16株、11群6株、12群6株、13群5株、15群3株であった。

2. PFGE

PFGEはSchwartzらの方法に準拠して以下のとおり行った。

1) アガロースブロックの調製：供試菌をBCYE α 寒天培地（栄研化学）に塗抹して37℃72時間培養後、平板上の菌苔を1 μ lディスポーザブルループで1/2量かき取ってPettIV溶液（1M Tris-HCl,

1MNaCl) 1ml に浮遊させ、McFarland No.0.5 になるように調整した。菌体を洗浄してから PettIV 溶液 1 ml に再懸濁し、2%インサートアガロース(BMA)と等量ずつ混和後、インサートモルド(Bio-Rad) に 100 μ l ずつ分注した。これを-20℃で 5 分間冷却し、さらに 4℃で 1 時間放置して固形化した。このアガロースブロック 1 個につき EC Lysis {6mM Tris-HCl(pH7.6), 1M NaCl, 0.5M EDTA, 0.2% Deoxycholic acid(Sigma), 0.5% N-Lauroylsarcosine(Sigma), 0.5% Polyoxyethylen(20)cetyl ether(Sigma)}500 μ l と 100mg/ml Lysozyme (Amersham Pharmacia Biotech Inc) 5 μ l および 2mg/ml Rnase { Ribonuclease A(Sigma)} 1 μ l をそれぞれマイクロチューブに入れて 37℃, 4 時間 インキュベートし、溶菌を行った。その後、ESP {1mg/ml Protinase K(Life technologies), 0.5M EDTA(pH 9.0), 1% N-Lauroylsarcosine(Sigma)} 500 μ l に 1 ブロックを入れ、50℃16~24 時間 インキュベートして徐タンパクを行った。反応後、Proteinase K を失活させるため、TE buffer {10mM Tris-HCl(pH7.4)} 1ml と PMSF {0.1mol/ml Phenylmethylsulfonyl Fluoride(Wako) , Isopropanol(Wako)} 13 μ l を加えた溶液に 1 ブロック入れ、常温で 2 時間振盪した。その後、新たな TE buffer と PMSF に交換して 6 時間静置した。その後、15 分おきに TE buffer を 6 回入れ替えてブロックの洗浄を行った後、4℃で保存した。

2)制限酵素による DNA の消化：DNA の消化には制限酵素 SfiI(Toyobo)を用いた。反応液は、10 \times M buffer 20 μ l, 2 \times ME {2-Mercaptoethanol(Sigma)} 14 μ l, DW 114.8 μ l と添付の M buffer に添加した SfiI特12.5U をそれぞれマイクロチューブに入れて調整した。これに 1/2 量アガロースブロックを入れ、50℃で 16~20 時間インキュベートして消化後、電気泳動を行った。

3)電気泳動：ゲルは 1.0%アガロースゲル{Certifide Molecular Biology Agarose (Bio-Rad)}を用いた。DNA 消化を行ったアガロースブロックの 1/3 量を泳動用ゲルのウェルに挿入した。また、サイズマーカーとして、Lambda DNA ladders(BMA) を用いた。

泳動槽は CROSSFIELD(ATTO)を使い、泳動用 buffer は 0.5 \times TBE buffer(1.78M Tris, 1.75M Boric acid, 10mM EDTA) を用いた。泳動条件は、Buffer 温度 14℃, 電圧 180V, パルスタイムは 45 秒, 泳動時間 20 時間とした。泳動終了後、直ちにエチジウムブロマイド(0.5 μ l/ml) を用いて 15 分間染色し、その後蒸留水で 15 分間脱色してから UV 照射下で写真撮影を行った。

3. PFGE パターンの解析

供試菌株のゲノム DNA 制限酵素切断パターンをスキャナで取り込んだ後、解析ソフト(Phoretix 社: 1D Advanced version 5.00)により、株間のクラスター解析を行い、UPGMA 法 (Unweight pair group method using arithmetic averages, 平均距離法)により系統樹を作成した。

4. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験には Etest (AB BIODISK, アスカ純薬) を用いて添付の technical guide に従って行った。対象薬剤はマクロライド系抗菌薬として erythromycin(EM), clarithromycin(CAM), azithromycin(AZM), テトラサイクリン系抗菌薬として minocycline(MINO), ニューキノロン系抗菌薬として levofloxacin(LVFX), sparfloxacin(SPF), β -ラクタム系抗菌薬として piperacillin(PIPC), imipenem(IPM), アミノグリコシド系抗菌薬として gentamicin(GM), および抗結核薬である rifampicin(RFP)の計 10 薬剤である。

BCYE α 寒天培地 (栄研化学) で供試菌を 3 日間前培養後、菌苔をかき取って滅菌生理食塩水に浮遊させ、McFarland No.1 となるように菌液を調製した。これを BCYE α 寒天培地 (メルク, 直径

150mm シャーレ(Greiner)に 60ml ずつ分注) に 0.5ml 塗抹してから Etest のストリップを培地上に密着させ、36℃で 3 日間培養し、ストリップの周囲に形成された発育阻止帯を観察した。MIC の判定は発育阻止帯の終末部とストリップとが交差した位置の目盛りを目視判読した。

C. 研究結果

1. *L.pneumophila* 1 群の PFGE 像

供試菌株の泳動像は、分子量約 50~850kbp (kilobase pair ; 1 kbp は 1,000 塩基対に等しい核酸の長さの単位) の間に 5 本から 15 本のバンドが識別され、多様な泳動パターンが認められた。その中で 450~500kbp の間に 2 本のバンドが認められたものが 28 株 (72%) あった。その由来別では、冷却塔水由来が 23 株(92%)、浴槽水由来が 3 株(42.9%)、土壌由来と臨床由来がそれぞれ 1 株(33.3%)であった。350kbp に 1 本のバンドが認められたものは 21 株(53.8%)あった。その由来別では、冷却塔水由来が 17 株(68%)、浴槽水由来が 3 株(42.9%)、土壌由来が 1 株(33.3%)であった。600kbp に 1 本のバンドが認められたものは 21 株(53.8%)あった。その由来別では、冷却塔水由来が 16 株(64%)、浴槽水由来が 4 株(57.1%)、土壌由来が 1 株(33.3%)であった。350kbp、450~500kbp および 600kbp にバンドが認められたものが 14 株(35.9%)あった。その由来別では、冷却塔水由来が 12 株(48%)、浴槽水由来が 2 株(28.6%)であった。300kbp にバンドが認められた 14 株(56%)と 750kbp にバンドが認められた 12 株(48%)は冷却塔水由来であった。850kbp にバンドが認められた 4 株(57%)は浴槽水由来であった。

2. PFGE 像のクラスター解析

供試菌株の PFGE 像をもとに系統樹を作成し、UPGMA クラスター解析を行った。冷却塔水由来である CT1 と CT24 が類似度 73%と最も高く、次に CT5 と CT6 が 67%、CT2 と CT1、CT24 がそれぞれ 64%を示したが、他の菌株の類似度はさらに低かった。由来別では、冷却塔水由来 25 株中 14 株(56%)と浴槽水由来 7 株中 2 株(29%)は同じ由来間での類似度が 50%≤であった。臨床由来と土壌由来では類似度が 20%>であった。異なる由来間の比較においては、CT16 と BW7 では 55%、CT5、CT6 および SL3 では 53%、BW1 と CL1 では 50%の類似度を示したに過ぎなかった。また、浴槽水由来株は同一群に分布する傾向が認められたが、冷却塔水由来株は全体的に分布した。

3. 各種薬剤に対する温泉水由来 *L.pneumophila* の MIC 分布

10 薬剤に対する供試菌株の MIC 分布について、EM では 0.25~2 μ g/ml に分布し、ピーク (最頻値) は 1 μ g/ml、CAM では 0.5~2 μ g/ml に分布し、ピークは 2 μ g/ml、AZM では 0.125~2 μ g/ml に分布し、ピークは 0.5 μ g/ml、MINO では 2~32 μ g/ml に分布し、ピークは 8 μ g/ml、LVFX では 0.25~1 μ g/ml に分布し、ピークは 0.5 μ g/ml、SPFX では 0.125~1 μ g/ml に分布し、ピークは 0.5 μ g/ml、GM では 0.25~4 μ g/ml に分布し、ピークは 2 μ g/ml、RFP では 0.032~0.5 μ g/ml に分布し、ピークは 0.125 μ g/ml であった。このように、供試した 10 薬剤中 8 薬剤が 1 峰性のピークを示したが、IPM では 0.004~1 μ g/ml に分布し、ピークは 0.016 μ g/ml と 0.125 μ g/ml に認められ、2 峰性であった。また、PIPC では 0.016~>256 μ g/ml に幅広く分布し、0.5 μ g/ml、16 μ g/ml および >256 μ g/ml にゆるやかなピークが認められた。このうち、 \geq 256 μ g/ml の極めて感受性の低い株が 20 株 (16.1%) あった。なお、血清群別の MIC 分布についても検討したが、いずれの血清群においても全体の分布と酷似しており、血清群別による顕著な特徴はみられなかった。

4. 各種薬剤における MIC90 の比較

各薬剤における 50%MIC 値 (MIC50) と 90%MIC 値 (MIC90) で比較した。供試薬剤ごとの MIC90 を比較すると、10 薬剤のうち RFP が 0.125 $\mu\text{g/ml}$ と最も優れた抗菌力を示した。次に、LVFX と IPM が 0.5 $\mu\text{g/ml}$, AZM と SPFX が 1 $\mu\text{g/ml}$, EM, CAM および GM が 2 $\mu\text{g/ml}$ であった。ところが、MINO は 16 $\mu\text{g/ml}$, PIPC は >256 $\mu\text{g/ml}$ と高い値を示した。RFP に比べ、LVFX と IPM は 4 倍、AZM と SPFX は 8 倍、EM, CAM および GM は 16 倍、RFP よりそれぞれ劣っていた。さらに MINO は 128 倍、PIPC は 4,096 倍の差があった。

D. 考察

L.pneumophila の疫学的解析は、血清学的手法を用いて調査するのが一般的である。しかし、集団感染が生じた際には、患者由来株と環境由来株との同一性を明らかにすることが重要であるため、菌株間の差を詳細に識別できる PFGE 法の方が血清学的手法より優れた方法であるといわれる。最近、河野らが臨床由来株と温泉水由来株について PFGE 法を用いて分子疫学的解析を行い、感染源を特定している。

今回、著者らは都内で分離された *L.pneumophila* 1 群の臨床および環境由来株について SfiI 特異性で酵素処理を行い、PFGE 法により泳動パターンの類似性を検討した。その結果、分子量およそ 50~850kbp の間に 5 本から 15 本のバンドが認められた。

Schoonmaker らが行った成績では、50~700kbp の範囲に 10 本から 15 本のバンドを認めており、低分子領域のバンドでは今回の成績と一致したが、高分子領域のバンドでは今回の方が 850kbp までバンドが認められた。

PFGE での泳動パターンから制限酵素断片長多型性解析 (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP) とクラスター解析を行ったところ、臨床由来、冷却塔水由来、浴槽水由来、土壌由来および水景用水由来との間には、明確な同一パターンは認められず、非常に多様な泳動パターンを示すことが明らかになった。冷却塔水由来株の RFLP では、450~500kbp の間に 2 本のバンドが認められたものが 23 株(92%), 350kbp に 1 本のバンドが認められたものが 17 株(68%), 600kbp に 1 本のバンドが認められたものが 16 株(64%), 350kbp, 450~500kbp および 600kbp にバンドが認められたものが 12 株(48%)あった。これらにより冷却塔水由来では、分離場所が異なっても 350kbp, 450~500kbp の間と 600kbp の位置にバンドが認められる傾向が高いと考えられた。クラスター解析において、冷却塔水由来では CT1 と CT24 が類似度 73%と最も高く、次に CT5 と CT6 が 67%, CT2 と CT1, CT24 が 64%であり、25 株中 14 株(56%)は類似度が 50%以上を示し、比較的類似性が高いと考えられた。また、浴槽水由来株は 850kbp の位置にバンドが現れる株が多く認められることが明らかになった。しかし、臨床由来株と土壌由来株では、特定した位置にバンドは認められなかった。

PFGE による泳動パターンについて、渡辺らは *L.pneumophila* 1 群の臨床分離株 31 株および環境分離株 18 株の計 49 株について RFLP 解析を行い、泳動パターンがきわめて多様性に富むこと、臨床分離株と環境分離株が区別できるような特異的な DNA パターンは認められなかったことを報告している。

一方、木内らの報告では、冷却塔水と浴槽水からそれぞれ分離した *L.pneumophila* 1 群の泳動パターンの比較を行い、同一の採取場所から分離した菌株は同一パターンを示したが、血清群が同じでも

採取場所が異なると泳動パターンは一致しなかった。これらのことから、今回供試した菌株は分離された場所がすべて異なるため、木内らが指摘しているように、泳動パターンが多様化していることが考えられた。

元来、土壤に生息しているレジオネラ属菌が温泉浴槽水にも侵入して増殖し、レジオネラ症の感染源となることが考えられる。著者らはレジオネラ症に関する疫学的研究の一環として、以前に全国各地の道端などの土壤から分離同定されたレジオネラ属菌の薬剤感受性を報告した。これら土壤由来株の薬剤感受性と温泉水由来株のそれを比べてみると、MIC 分布は類似していたものの、温泉水由来株で、低い傾向が認められた。両者の感受性を MIC90 で比較すると、MINO と SPFX ではそれぞれ 16 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ の同値を示したが、EM、CAM、AZM、LVFX、GM、RFP ではいずれも温泉水由来株の方が 2 倍高い MIC 値を示した。さらに、IPM では 8 倍高い 0.5 $\mu\text{g/ml}$ であり、PIPC では >256 $\mu\text{g/ml}$ で 32 倍以上の差が認められた。

また、市販園芸用土から分離同定されたレジオネラ属菌と温泉水由来株の MIC90 を比較すると、供試した 10 薬剤のうち 7 薬剤で MIC 値が同じであったが、MINO、SPFX、IPM ではそれぞれ 2 倍ずつ園芸用土由来株の方が高い値を示した。

一方、王は、EM、CAM、SPFX における MIC90 をそれぞれ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、0.016 $\mu\text{g/ml}$ 、0.063 $\mu\text{g/ml}$ と報告しており、今回の成績より 4 倍から 16 倍、CAM では 128 倍感受性が高かった。しかし、王が供試した 50 株の内訳をみると、半数が *L.pneumophila* 以外の菌種であり、また基準株や標準株がその半数を占めていたことから、今回とは異なった成績を示したものと考えられた。

レジオネラ症は感染症の一つであるから、その治療に抗菌薬が有効であることはいままでもない。しかし、レジオネラ属菌の多くが β -ラクタマーゼを産生したり、細胞内増殖性を有することから、治療に使用される薬剤は MIC 値が低いだけでなく、細胞内移行性の良好なものでなければならない。そこで一般的には EM、CAM、RFP およびニューキノロン系薬剤が使用されている。

Edelstein と Meyer は臨床由来株を対象に薬剤感受性試験を行い、RFP の MIC が 0.025 $\mu\text{g/ml}$ から 0.125 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、高い感受性を示したことを報告している。また、EM では $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ の MIC であった。しかし、GM の MIC は 0.25 $\mu\text{g/ml}$ から 2 $\mu\text{g/ml}$ に分布しており、感受性はやや低かった。さらに、MINO では 1 $\mu\text{g/ml}$ から 8 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示し、低い感受性であった。

また、Orrison らの報告では、環境由来株と臨床由来株の MIC 測定の結果、RFP では両者に差はなく、いずれも 0.03 $\mu\text{g/ml}$ から 0.06 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、高い感受性を認めている。ところが、EM ではこれよりやや低い感受性であり、環境由来株では 0.12 $\mu\text{g/ml}$ から 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、臨床由来株では 0.06 $\mu\text{g/ml}$ から 0.5 $\mu\text{g/ml}$ と両由来間でわずかに差が認められた。また、GM では両由来株とも 1 $\mu\text{g/ml}$ から 2 $\mu\text{g/ml}$ に分布し、両由来間で差は認められなかった。

村上らがわが国の臨床由来株について Etest を用いて MIC 測定を行った成績では、特に耐性菌の出現は認められず、諸外国の報告と同様にマクロライド系や RFP に高い感受性を示している。この成績と今回の温泉水由来株の MIC90 を比較すると、GM を除く 9 薬剤で臨床由来株の方が MIC 値が低く感受性が高かった。CAM では 32 倍、PIPC では 16 倍以上の差がみられたが、その他の薬剤では温泉水由来株の方が 2 倍から 8 倍高い値を示し、温泉水由来株の感受性はわずかに低かった。このように、温泉水由来株の MIC 分布の方が臨床由来株に比べ、やや耐性側にシフトしている傾向が認められた。

E. 結論

以上のように、同一血清群の *L.pneumophila* であっても PFGE 泳動パターンは多岐に渡ることが判明した。こうしたなかで泳動パターンが一致することは両菌株が同一由来で、しかも同時期に生息していたことを強く示唆するものであり、疫学的調査には重要な情報になるものと考えられた。

また、全国各地の温泉浴槽水から分離された *L.pneumophila*124 株について薬剤感受性を検討したところ、供試薬剤 10 薬剤のうち RFP の MIC₉₀ が 0.125 $\mu\text{g/ml}$ と最も優れた抗菌力を示した。次に、LVFX と IPM が 4 倍差の 0.5 $\mu\text{g/ml}$, AZM と SPFX が 8 倍差の 1 $\mu\text{g/ml}$, EM, CAM および GM が 16 倍差の 2 $\mu\text{g/ml}$ であった。ところが、MINO は 16 $\mu\text{g/ml}$, PIPC は >256 $\mu\text{g/ml}$ と高い値を示し、それぞれ 128 倍および 4,096 倍、RFP より劣っていた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furuhata,K., Dogasaki,C., Hara,M., Fukuyama,M. : Inactivation of *Legionella pneumophila* from whirlpool bath water by grapefruit (*Citrus paradisi*) seed extract. *Biocontrol Sci.*, 8: 129-132 (2003)
- 2) 古畑勝則, 宮本比呂志, 福山正文 : 市販園芸用土からのレジオネラ属菌の分離状況および分離株のアメーバ内増殖性と薬剤感受性. *環境感染*, 19 : 印刷中 (2004)
- 3) 古畑勝則, 原 元宣, 福山正文 : *Legionella pneumophila* 血清群 1 群のパルスフィールドゲル電気泳動パターン. *防菌防黴*, 32 : 印刷中 (2004)
- 4) 古畑勝則, 原 元宣, 福山正文, 吉田真一 : 温泉水由来 *Legionella pneumophila* の薬剤感受性. *防菌防黴*, 32 : 印刷中 (2004)

2. 学会発表

- 1) 古畑勝則, 福山正文 : 全国各地の温泉水におけるレジオネラ属菌の生息状況. 第 19 回 日本環境感染学会 (2004. 2) 横浜