

## 2. 試料の濃縮

試料 500ml を 6,000rpm、30 分間の遠心分離により最終的に 5ml に再懸濁し、100 倍濃縮試料を調製した。

## 3. 培養法によるレジオネラ属菌の検出

「新版レジオネラ症防止指針」に準拠し、滅菌小試に分注した 100 倍濃縮試料 1ml に 1ml の 0.2M HCl-KCl 溶液 (pH2.2) を加え、十分攪拌してから室温に 15 分間放置した。この試料を WY0 $\alpha$  寒天培地と GVPC $\alpha$  寒天培地にそれぞれ 0.1ml ずつ滴下し、コンラージ棒で塗抹した。これを 37°C、7 日間培養後、両培地上でレジオネラ属菌の特徴を持つ集落を計数するとともに、これらの培地上から数個の集落を釣菌し、血液寒天培地と BCYE $\alpha$  寒天培地に塗抹して 37°C で純培養と同時にシステイン要求性試験を行った。培養 3 日後、血液寒天培地には発育せず、BCYE $\alpha$  寒天培地にのみ発育した菌株をレジオネラ属菌と推定し、グラム染色によって陰性桿菌であることを確認した。菌種の同定にはラテックス凝集反応、免疫血清凝集反応、DNA-DNA ハイブリダイゼーションを用いた。なお、この試験での検出限界は 10 CFU/100ml である。

## 4. LAMP 法によるレジオネラ属菌の検出

LAMP 法は市販の「レジオネラ検出試薬キット E」を用い、添付資料に準拠した。まず、100 倍濃縮試料 2ml を 13,000 $\times$ g、10 分間、4°C で遠心分離し、上清を除去して 40 $\mu$ l 程度を残し、その沈査に「Extraction Solution for Legionella」50 $\mu$ l を添加した。次にボルテックスミキサーで攪拌混合してから 95°C、15 分間加熱処理後、直ちに急冷し、1M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) 8 $\mu$ l を添加して中和した。再度同条件で遠心分離し、上清を核酸抽出液とした。氷上にて LAMP 法反応試薬「マスターミックス」20 $\mu$ l に核酸抽出液 5 $\mu$ l を加え、Loopamp リアルタイム濁度測定装置を用いて 65°C で 60 分間増幅反応を行った。1 時間以内に増幅に伴う特徴的な濁度上昇が認められた試料をレジオネラ属菌陽性と判定した。なお、酵素失活処理を 80°C、2 分間行った。この試験での検出感度は 10 Cells/100ml である。

## C. 研究結果

### 1. 培養法及び LAMP 法によるレジオネラ属菌の検出状況

培養法及び LAMP 法による 125 試料におけるレジオネラ属菌の検出状況をみると、両法で本菌が共通して検出された試料が 38 試料 (30.4%)、また検出されなかった試料が 47 試料 (37.6%) あり、合計 85 試料 (68.0%) が両法の一致率であった。また、培養法陰性であったが LAMP 法陽性の試料が 38 試料 (30.4%) あった。逆に培養法陽性で LAMP 法陰性の試料が 2 試料 (1.6%) あった。これらのことから両法による検出

状況に有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められた。すなわち、LAMP 法によりレジオネラ属菌を検出すると、危険倍率 0.303、相対危険度 0.526、寄与危険度 0.288 となり、検出率は培養法より高くなった。

## 2. 培養法により検出されたレジオネラ属菌

培養法によりレジオネラ属菌が検出された 40 試料の菌数分布をみると 10-40 CFU/100ml が 18 試料 (45.0%) と最も多かった。次に 50-90 CFU/100ml、100-400 CFU/100ml および 1,000-4,000 CFU/100ml がそれぞれ 6 試料 (15.0%) であった。なお、10CFU/100ml 未満 (すなわち不検出) が 85 試料 (68.0%) あったが、このうち選択培地上にレジオネラ属菌以外の細菌や真菌が早期に発育することにより、レジオネラ属菌の発育が確認できず、結果として陰性と判定された試料が 7 試料 (8.2%) あった。分離された 49 株を同定したところ、42 株 (85.7%) が *L. pneumophila* に同定され、他に *L. micdadei* や *L. gormanii* がわずかながら同定された。また、*L. pneumophila* の血清型別では 1 群が 17 株 (34.7%) と最も多く、次に 6 群が 8 株 (16.3%) であった。その他、3 群、4 群、10 群に比較的多く型別された。

## 3. レジオネラ属菌数と LAMP 法によるレジオネラ属菌の検出状況

温泉浴槽水 125 試料について、LAMP 法によりレジオネラ属菌の検出を試みた結果を培養法による菌数分布と比較した。培養法で不検出 (10 CFU/100ml 未満) の 85 試料のうち、LAMP 法では 38 試料 (44.7%) が陽性を示した。また、培養法で 10-40 CFU/100ml のレジオネラ属菌が検出された 18 試料については、LAMP 法では 16 試料 (88.9%) が陽性を示したが、2 試料 (11.1%) は陰性であった。これら LAMP 法で陰性を示した 2 試料のレジオネラ属菌数はそれぞれ 10 CFU/100ml、30 CFU/100ml であり、分離された菌種はいずれも *L. pneumophila* であったが、血清型は不明であった。なお、50 CFU/100ml 以上のレジオネラ属菌が検出された 22 試料では、すべて LAMP 法陽性であった。

## D. 考察

レジオネラ属菌の検出方法において、一般的に用いられている培養法の最大の欠点は検査時間が長いことである。このため、迅速検査法の一つとして核酸の検出が普及しつつある。両法の相違点は、培養法では培地上に集落を形成できる生菌のみを対象とするのに対し、遺伝子検査法では、生菌に加え、死菌や培養不能 (VNC) 菌、さらに核酸のみでも検出可能である。したがって、培養法と遺伝子検査法の結果を完全に一致させることは困難である。

今回は 125 試料の温泉浴槽水について、従来の培養法と近年開発された LAMP 法によってレジオネラ属菌の検出状況を比較検討したところ、培養法でレジオネラ属菌が

検出された 40 試料については LAMP 法では 38 試料 (95.0%) が陽性を示し、一致率は高かった。なお、培養法で陽性を示し、LAMP 法で陰性を示した 2 試料については、試料中に不溶性物質が多く、温泉浴槽水中に存在する増幅阻害物質の影響が考えられた。また、培養法によって不検出であった 85 試料のうち、LAMP 法では 38 試料 (44.7%) が陽性を示した。Ng らは冷却塔水のレジオネラ属菌検査において、培養法では検出されない試料でも PCR 法では陽性を示す要因として死菌や VNC 菌の存在を指摘している。温泉浴槽水においても同様な影響が考えられ、適切な塩素消毒が行われていても遺伝子検査法では陽性を示す場合がある。このことから、遺伝子検査法は培養法と異なり、陽性結果が即感染性の有無にはつながらない。すなわち、遺伝子検査陽性の温泉浴槽水が直ちに感染源になるとは限らない。この点が今後、遺伝子検査法をレジオネラ属菌の迅速検査法として採用する場合に十分考慮すべき課題である。

一方、塩素などの酸化性殺菌剤を添加した場合、死菌の核酸は分解され、殺菌剤濃度と接触時間によっては遺伝子検査法で不検出となることが報告されている。また、近年 RNA 迅速増幅技術として研究開発されている NASBA 法や TRC 法などが多分野で検討されている。こうした技術の導入により遺伝子検査と培養法による結果を近づけることが可能になるであろう。

## E. 結論

以上のように、現在のところ LAMP 法は従来の培養法に比べて検出率が高く、しかも試験操作が簡便なうえ、数時間で判定が可能であることからレジオネラ属菌の迅速検査法の一つとして有用であった。しかしながら、遺伝子検査法では検出原理が培養法と異なるため、LAMP 法の陽性が必ずしも感染の危険性を示していることにはならない。この点が今後、遺伝子検査法をレジオネラ属菌の迅速検査法として指針に採用する場合、十分考慮すべき課題である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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: 306-310 (2004)
- 2) 安中敏光, 小島 禎, 池戸正成, 古畑勝則: LAMP 法による環境水からの Legionella 属菌の検出. 防菌防黴誌, 32: 195-201 (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. 防菌防黴誌, 32: 287-291 (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. 防菌防黴誌, 32 : 343-347 (2004)
- 5) 古畑勝則, 原 元宣, 福山正文, 吉田真一: 温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況. 感染症誌, 78 : 710-716 (2004)
- 6) Furuhata, K., Annaka, T., Ikedo, M., Fukuyama, M., Yoshida, S. : Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and conventional culture for the detection of Legionella species in hot spring water samples in Japan. Biocontrol Sci., (in submitting)

## 2. 学会発表

- 1) 古畑勝則: レジオネラ属菌の汚染対策と検査法の将来展望 (パネルディスカッション). 日本防菌防黴学会第31回年次大会 (2004. 5) 東京.
- 2) 古畑勝則: レジオネラ属菌の試験法 (現状と問題点) (講演). 日本防菌防黴学会 2004年度秋季合同シンポジウム (2004. 10) 福井.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## *Legionella pneumophila* 環境分離株の病原性評価と病院給湯設備の レジオネラ除菌に関する研究

分担研究者 宮本 比呂志 (産業医科大学・医学部・微生物学)

### 研究要旨

水環境から分離された *L. pneumophila* は臨床分離株でないため病原性を有する強毒株かどうかはわからない。そこで、1986年より2004年にかけて国内（1都1道1府10県）で分離された215株の *L. pneumophila* 環境分離株の病原性をアメーバ寒天法で調べた。その結果、すべての水環境分離株が病原性を持っていることが明らかになった。この結果は、「培養検査法は病原株の数を数える定量法である」ことも示唆している。人工水環境からレジオネラが分離培養された場合には病原株と考え、その水環境の衛生管理を徹底することが望ましい。一方、近年、国内において給湯設備が感染源または感染源と疑われるレジオネラ院内感染が発生している。しかし、病院の給水・給湯設備のレジオネラ汚染の実態とその効果的な除菌法の報告はない。病棟浴室のシャワーヘッド拭き取り検査で *L. pneumophila* が検出された大学病院において、中央循環式の給湯設備におけるレジオネラ汚染調査とその除菌を一年間にわたり行った。その結果、病院給湯施設において、湯待ち時間が長く、湯温が低い給湯栓を選んでレジオネラ培養検査を行うと、レジオネラ汚染率は約29%と高率であること、その除菌には（1）給湯水の昇温循環運転（75℃で24時間）とその間の末端給湯栓からの放水作業（2）貯湯槽の清掃（3）給湯温度を上げて維持管理することが安価で有用であることが明らかとなった。定期的な給水・給湯水のレジオネラ検査を実施し、菌が検出された場合には病原株と考えて、速やかに除菌対策をとることにより、レジオネラ院内感染を予防することができると思われる。

### 研究背景と目的

生活環境水よりの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、分担研究者は平成14年度の研究において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）を新たに開発し、報告した（感染症誌 2003；77：343-345）。今年度はこのアメーバ寒天法を使用して、1986年

より 2004 年にかけて国内（1 都 1 道 1 府 10 県）で分離された 215 株の *L. pneumophila* 環境分離株の病原性を調べた。また、国内において給湯設備が感染源または感染源と疑われる院内感染が発生している。欧米の報告によると、レジオネラ症の 25～45% が院内感染であり、その主な感染源は給水・給湯設備である。そのため、給水・給湯設備のレジオネラ管理に関する研究報告も多い。しかしながら、本邦では、レジオネラ発見の歴史的経緯から病院空調冷却塔水にレジオネラ管理の主眼が据えられたままであり、病院の給水・給湯設備のレジオネラ汚染に関しては、その実態さえ不明である。病棟浴室のシャワーヘッド拭き取り検査で *L. pneumophila* が検出された大学病院において、中央循環式の給湯設備におけるレジオネラ汚染調査とその除菌を一年間にわたり実施した。

## 研究方法

（環境分離株の病原性評価に関する研究）

1986 年より 2004 年にかけて国内（1 都 1 道 1 府 10 県）の水環境から分離された *L. pneumophila* 215 株を供試菌とした。同一のクローンに由来する菌株を重複して調べることを極力避けるため、分離年月、場所、血清群を参考にして供試菌株を選んだ。一部の菌株はパルスフィールド電気泳動により異なる遺伝子型であることを確認して使用した。供試菌の由来は冷却塔水、浴槽水、給湯水、シャワーヘッド内停滞水、噴水でそれぞれ 27, 170, 4, 2, 12 株であった。それらの血清群は 1 から 10 までの全てにわたっており、順に 56, 5, 30, 17, 42, 53, 2, 3, 2, 5 株であった。アメーバ寒天法は以前に報告した方法で行い、2 度繰り返し結果の再現性を確認した。陽性対照として病原株である *L. pneumophila* Philadelphia-1 (ATCC33152)、および国内の臨床分離株 18 株を用い、陰性対照として弱毒株である *L. pneumophila* 25D を使用した。

（病院給湯設備のレジオネラ除菌に関する研究）

病院の概要：産業医科大学病院は本館（地上 10 階地下 1 階）、東別館（地上 2 階）、西別館（地上 4 階地下 1 階）の 3 つの建物で構成されており、延べ床面積は 54916.5 m<sup>2</sup> である。病床数は 618 で、21 の診療科よりなる特定機能病院である。

給水・給湯設備の概要：給水は北九州市の供給する水道水と産業医科大学が掘削した井戸よりの井水を併用している。これらを受水槽に引き込んで貯留し、揚水ポンプで病院本館屋上の高架貯水槽に揚水した後、重力により各部署に供給

している。給水の残留塩素濃度は毎日測定・記録されており、0.6～0.8 ppm に維持管理されている。貯湯槽への補給水はこれらの貯水槽より供給されており、給湯方式は中央循環式である。その概要を表 1 に示した。

試料採取：シャワーヘッドの拭き取りは滅菌綿棒を使用して行なった。給湯水試料は初流水を放流後、温度計で湯温が一定になったことを確認・記録した後、滅菌ボトルに約 400 ml 採取した。検水の残留塩素濃度と pH の測定は携帯型デジタル水質計（ハイドロクオント 501, 東西化学産業株式会社, 大阪）で行った。

培養検査：拭き取り試料は、WYO $\alpha$ （栄研化学株式会社, 東京）または GVPC 寒天培地（日本ビオメリュー株式会社, 東京）に直接塗布した。その後 37℃ で 10 日目まで培養した。給水・給湯試料は指針に準じ、遠心またはろ過濃縮・酸処理後、0.1 mL ずつ 2 枚の WYO $\alpha$  または GVPC 寒天培地に塗布した。37℃ で 10 日目まで培養を続け、増殖してきたレジオネラと疑われる灰白色・浸潤な集落を計数した。2 枚の培地で得られた集落数より平均を算出し、試料水 100 mL あたりの集落数（CFU/100 mL）を算出した（検出限界は 5 CFU/100mL）。

PCR 法とパルスフィールド電気泳動法：迅速な対策を講ずるため、必要に応じ LEG225 と LEG858 プライマーを使用して PCR 法を行った。また、パルスフィールド電気泳動に関しては「ジーンパス グループ 5 試薬キット」（日本バイオラッド, 東京）を使用し、添付手順書に従い *Sfi*I で DNA を切断した。切断された DNA を 1% アガロースゲルで CHEF mapper システム（日本バイオラッド）を使用して電気泳動した。

給水量と灯油使用量：2002 年度と 2003 年度の病院全体で使用した給水量および灯油量は、月別集計簿より転記した。給湯水として使用された給水量は給湯設備の維持管理に関する日報から月別の給湯水量を集計した。また、使用用途ごとの灯油量は記録されていなかったため、給湯水量を給湯温度に昇温するために必要とした熱量を算出し、灯油量に換算した (8450 kcal/L)。これを給湯ボイラーに使用された灯油量とした。但し、貯湯槽への補給水温は測定されていなかったため、便宜的に 4 月～10 月の給水温を 20℃、11 月～翌年 3 月を 10℃として必要熱量を概算した。

## 研究結果

（環境分離株の病原性評価に関する研究）

水環境より分離された 215 株は全てアメーバ寒天培地上に集落を形成した。病原

株である Philadelphia-1 株と臨床分離株 18 株も全てアメーバ寒天培地上に集落を形成したが、弱毒株である 25D は集落を形成することが出来なかった。これらの結果は、調べた全ての水環境分離株は病原性を持っていることを示している。

#### (病院給湯設備のレジオネラ除菌に関する研究)

今回の調査・除菌対策実施期間中に合計 52 カ所 (のべ 119 回) のレジオネラ検査を行なった。その概要は表 2 に示した。表 2 には示していないが、この期間中に定期検査として行われた空調冷却塔水、加湿器水、人工呼吸器加湿水の培養検査ではレジオネラは検出されなかった。また、レジオネラ肺炎の院内発生は認めなかった。

昇温と給湯栓類よりの放水による除菌：貯湯槽水でレジオネラ汚染が検出されたことより、病院給湯設備全体のレジオネラ汚染が危惧された。そこで、貯湯槽設定温度を 75℃ に上げて 24 時間運転し、その間に末端給湯栓から放水を行うことで給湯設備全体の除菌を試みた。その概略は表 3 に示した。高層階系では 381 カ所、低層階系では 474 カ所の合計 855 カ所の末端給湯栓から放水が行われた。放水実測温は高層階系統で最高 71℃、最低 59℃ で平均湯温は 66℃ であった。60℃ 未満の湯温の給湯栓は 1 カ所であった。一方、低層階系統では最高 71℃、最低 45℃ で平均湯温は 64℃ であった。60℃ 未満の湯温の給湯栓は 80 カ所あった。これらの給湯栓は外来診察室や放射線部撮影室などに集中していた。昇温循環中も給湯水の使用を禁止しなかったため、患者と病院職員の火傷を防ぐため、昇温循環中には全ての給湯栓設置個所に給湯配管の熱湯消毒中である旨の警告文を貼付し、注意の喚起をはかった。合計 3 回の昇温・除菌対策を実施したが、火傷等の事故の発生はなかった。また、昇温運転による給湯配管の膨張に起因する漏水事故も発生しなかった。

4 階病棟給湯栓の広範囲な汚染と除菌：2004 年 2 月 9 日の定期検査 (20 カ所) で高層階系統の 2 カ所 (4 階病棟) よりレジオネラが検出された。高層階系統の除菌は「湯量が少ない」「湯がでない」などの状況も無く、湯温が高い状態で行われていたため、この原因を調査した。その結果、汚染給湯栓が見つかった病棟は昇温除菌作業時に給排水配管改修工事のため病棟が閉鎖されていたこと、そのため末端給湯栓からの放水作業が実施されていなかったことが判明した。即刻、汚染給湯栓と同じ配管により給湯されている給湯栓全ての放水を約 1 時間行い、汚染給湯栓は使用禁止とした。3 月 1 日に汚染給湯栓およびその給湯栓と同じ配管の



最も上流（4階医師当直室）と下流（4階医師控室）および5階病棟の給湯栓の合計5カ所よりそれぞれ採水し、再検査を行った。培養開始、4日後の3月5日にレジオネラと疑われる集落が全ての検水で観察され、PCR法でレジオネラであることが確認された。菌数が多いこと、全ての検体でレジオネラが検出されたことより早急に昇温循環と放水作業を行った（表3）。3月10日に4、5階病棟の16カ所で採水し検査したところ、いずれの検水からもレジオネラは検出されなかった。

除菌の確認：2003年7月から2004年3月までの間に、汚染が検出された給湯栓（8カ所）、シャワーヘッド（4カ所）、貯湯槽水（3カ所）の合計15カ所について2004年5月24日に培養検査を行った。いずれの試料からもレジオネラは検出されず、検出限界以下に除菌できたと判断した。

分離菌株の遺伝子型別：給湯水より分離された菌株から分離場所、日時、血清群などが異なる15菌株を選んで遺伝子型別を試みた。表4と図1に示したように15菌株は3つの遺伝子型に分類できた。

昇温に伴う給水と灯油使用量の変化：表5に給湯水の昇温による給水、給湯水、灯油使用量の変化を示した。貯湯槽水の設定温度が62℃であった2002年度と2003年度の4～7月期の月別平均使用量がそれぞれ同じ（前年同期比が1）と仮定して、貯湯槽の設定温度を4℃上げて66℃で運転した2003年8～3月期と設定温度が62℃であった2002年8～3月期を比較した。その結果、給湯温度を4℃あげても給湯ボイラーで使用された灯油量は前年度に比べ約5%減少していた（表5）。給湯温度を上げたにもかかわらず給湯ボイラーの灯油使用量が減った理由は給湯水使用量が約12%減少したためであった（表5）。この減少の原因として、病棟において給湯温が上昇しているため湯温を下げるために使われる給水の混合量が増えていることが疑われた。しかし、病院全体の給水量の増加は認められなかった（表5）。除菌作業及び給湯温度を上げて維持管理することで水道料金および灯油料金の負担が増えることはなかった。

## 考察

（環境分離株の病原性評価に関する研究）

各種のレジオネラ検出法が開発され、感度、特異性、操作性、所要時間、費用を基準にしてそれぞれの検査法の優劣が論じられてきた。レジオネラは病原細菌であるにも拘わらずその検出法が病原株を検出する方法であるか否かという観点からの

検査法の評価は未だなされていない。水環境より分離培養された *L. pneumophila* は全て病原株であるという本研究の結果は、「培養検査法は病原株の数を知る定量法」であることを示唆している。同一の水環境に強毒株と弱毒株がアメーバとともに共存・棲息している場合、強毒株の方がアメーバ内で増殖出来るため弱毒株に比べて環境水中での菌数が多くなることが予測される。その結果、培養法では優占株である病原株が検出されやすくなると推察される。生きているが培養できない状態の *L. pneumophila* をアメーバと共培養することで集落形成能を回復させると、その株は病原性を持つことが報告されている。これは培地上での集落形成能がヒトへの病原性と密接に関連することを示唆しており、今回の知見を裏付けている。人工水環境からレジオネラが分離培養された場合には病原株と考え、その水環境の衛生管理を徹底することが望ましいと思われる。

#### (病院給湯設備のレジオネラ除菌に関する研究)

レジオネラ属菌発見の端緒となった 1976 年の米国フィラデルフィアにおける大規模な集団発生は空調冷却塔水が感染源であった。そのため、空調冷却塔水のレジオネラ汚染に注目が集まり、本邦でも実態調査や除菌対策が精力的に行われてきた。また、欧米では空調冷却塔が稼働していない冬期を含め、年間を通じてレジオネラによる院内感染が発生することから、院内感染に関しては、給湯水のレジオネラ汚染が空調冷却塔水と同等に重視され、多くの研究が行われてきた。しかしながら、我が国では病院給湯水のレジオネラ汚染に関する報告が非常に少なく、その実態さえよくわからない状況にある。レジオネラ院内感染を予防するためには、最多の感染源は病院の給水・給湯設備であることを医療従事者に啓蒙する必要がある。

今回の調査・除菌対策実施期間中に合計 52 カ所で検査が行われ、15 カ所 (29%) から汚染が検出された。レジオネラ汚染が見つかりやすい湯待ち時間が長く、湯温の低い給湯栓を選んだのでこの汚染率は病院給湯設備全体の汚染率を示しているわけではないが、貯湯槽水の汚染は設備全体の汚染につながるため最も深刻な問題であった。低層階系統の貯湯槽給湯水から分離された株と返湯水から分離された株の遺伝子型が同一であったことは汚染が低層階全体に広がっていたことを示している。本院では低層階に湯の使用量が多い厨房があるため、高層階より貯湯量の多い貯湯槽を使用している。そのために貯湯槽内に温度成層が形成されやすく、また、給湯温度も低かったために貯湯槽内でレジオネ

ラの生存を許したことが疑われる。また、10階の特別浴槽シャワーヘッドより分離された株と4、5階病棟の給湯水から分離された株は、それぞれ高層階系貯湯槽の返湯水からの分離株と遺伝子型が一致していた。高層階系貯湯槽の給湯水からは菌が検出されなかったことより考えて、末端給湯栓の汚染が返湯水を介して貯湯槽を汚染することが示された。遺伝子型別により4階医師当直室が4・5階病棟の配管系統の最も上流に位置していたため、当直室の汚染が同一配管系統全ての汚染につながったことも明らかとなった。今回の遺伝子型別検査の結果より中央循環式の給湯設備では末端給湯水の汚染であっても貯湯槽の温度管理を含めた維持管理が適切になされないと容易に設備全体の汚染につながることが示唆された。末端給湯水の汚染が判明した場合はその汚染を除去するだけでなく、貯湯槽水の検査も行い、維持管理を確認し、必要に応じ変更することが大切と思われる。

末端給湯水の汚染の最大の原因が給湯水の停滞であることはよく知られている。一旦汚染がおこると汚染給湯栓局所での通常の給湯温度（55℃程度）での放水作業では除菌は困難で、昇温循環と放水作業が必要であった。循環ループ内の給湯水の昇温循環だけでは不十分で、放水作業により枝管内の停滞水を排出することが汚染の防止と除菌に重要と考えられた。病院内で給湯水の停滞がおりやすい施設・場所は特別浴槽シャワーヘッド、医師当直室、外来診療部門、放射線部撮影室であることが明らかとなった。これらの場所は使用頻度が極端に少ない給湯栓が多数あり、湯待ち時間が長く、湯温の低い給湯栓も多かった。これらの給湯栓では定期的な放水作業による汚染防止がもっとも重要と考えられる。これらの場所はレジオネラの末端汚染を定期的に監視する採水場所として有用で、汚染監視の基準点に最適と考えられる。

今回は除菌対策として給湯水の75℃での昇温運転（24時間）と末端給湯栓類からの放水作業、そして貯湯槽の清掃を行った。それらに加え、貯湯槽水の設定温度を4℃上げて66℃で維持管理した。このことにより前年度に比べて水道料金や灯油料金の負担が増えることが予想されたが、負担増は無かった。これは給湯水の利用量が減ったことに起因していた。今回の除菌法は病院全体としての費用負担の増加もなく実施できるもので非常に有効であった。末端給湯栓の汚染が施設全体の汚染につながる中央循環式の給湯設備では貯湯槽の維持管理に加えて停滞水の防止が非常に重要と思われる。

## 健康危険情報

該当無し

## 研究発表

### 1. 論文発表

アメーバ寒天法を使用した *Legionella pneumophila* 環境分離株の病原性評価  
感染症学雑誌 2004; 78(10): 923-924.

病院給湯設備におけるレジオネラ汚染とその除菌  
環境感染 2004; 19(4) : 483-490.

レジオネラの病原性発現機構  
Mebio 2004; 21(12): 63-68.

### 2. 学会発表

レジオネラ属菌の細菌学的特性 日本防菌防黴学会 第31回年次大会 パネル  
ディスカッション：水環境におけるレジオネラ属菌検査法の現状と将来,平成1  
6年5月,東京

アメーバ寒天法を使用した *Legionella pneumophila* 環境分離株の病原性評価  
第57回 日本細菌学会九州支部総会,平成16年9月,福岡

アメーバとレジオネラの宿主寄生体関係 第57回 日本寄生虫学会南日本支  
部大会 特別講演,平成16年10月,北九州

病院給湯設備のレジオネラ汚染とその除菌 第20回 日本環境感染学会総会,  
平成17年2月,神戸

## 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

表1. 給湯設備の概要

系統数	2
貯湯槽の容量と数	高層階系統2400 L, 2基(横型) 低層階系統3300L, 2基(横型)
貯湯槽の材質	SUS 304
配管方式	下向き式 複管式
配管材質	耐熱性塩化ビニルライニング鋼管HTLP
加熱方式	蒸気による間接加熱

表2. 産業医科大学病院給湯水のレジオネラ検査結果とその対策

年月	試料の種類	試料数	陽性試料数 (重複試料数)*	レジオネラ菌数 範囲、CFU/100ml	菌種(血清群)	対策
2003.7	シャワーヘッド	11	5(1)	2-124**	<i>L. pneumophila</i> (1)	汚染シャワーより放水 シャワー(ホースを含む)の交換
8	貯湯槽水	4	3	25-500	<i>L. pneumophila</i> (1, 5, 6)	貯湯槽設定温度を66℃へ変更 高層階系貯湯温度を75℃で24時間運転 高層階の給湯栓類(381カ所)の放水
8	シャワーヘッド	4	0			
9	高層階系貯湯槽水	2	0			
10	病棟給湯水	12	1	40	<i>L. pneumophila</i> (1)	汚染給湯栓より放水
10	病棟給湯水	1	0			
10	シャワーヘッド	6	0			
10	低層階系貯湯槽水	2	0			
10	病棟・外来給湯水	9	2	95, 320	<i>L. pneumophila</i> (1)	低層階系貯湯温度を75℃で24時間運転 低層階の給湯栓類(474カ所)の放水
11	病棟・外来給湯水	2	0			
2004.2	シャワーヘッド	6	0			
	貯湯槽水	4	0			
3	病棟給湯水	20	2	75, 3000	<i>L. pneumophila</i> (5, 6)	汚染給湯栓より放水
3	病棟給湯水	5	5(2)	100-2860	<i>L. pneumophila</i> (5, 6)	高層階系貯湯温度を75℃で24時間運転 4.5階の給湯栓類(128カ所)の放水
3	4,5階病棟給湯水	16	0			
5	シャワーヘッド	4	0			
	貯湯槽水	3	0			
	病棟・外来給湯水	8	0			

\* 同一箇所より異なる日に試料を採取, \*\*CFU/拭き取り試料

表3. 昇温除菌作業の概要

除菌対象場所	昇温運転実施日時(2003年)	末端給湯栓放水日時	放水給湯栓数	放水実測温(平均)
高層階系統	9月9日0~24時	9月9日7時~9時	381	59~71°C(66)
低層階系統	10月10日0~24時	10月10日7時~18時	474	45~71°C(64)
高層階系統(追加)	*3月5日21時~3月6日21時	3月6日8時~9時	128	53~70°C(60)

\*2004年

表4. 給湯水由来*L. pneumophila*の遺伝子型別

遺伝子型	菌株(血清群)	分離年月日*	由来(給湯系統)
I	UOEH101(1)	2003年7月17日	10階シャワーヘッド(高層)
	UOEH104(1)	2003年7月22日	10階シャワーヘッド(高層)
	UOEH109(1)	2003年7月22日	10階シャワーヘッド(高層)
	UOEH111(1)	2003年7月28日	貯湯槽返湯水(高層)
II	UOEH113(6)	2003年7月28日	貯湯槽返湯水(高層)
	UOEH123(6)	2004年2月9日	4階病室(高層)
	UOEH125(6)	2004年2月9日	4階病室(高層)
	UOEH128(6)	2004年3月1日	4階病室(高層)
	UOEH130(6)	2004年3月1日	4階医師控室(高層)
	UOEH132(6)	2004年3月1日	4階医師当直室(高層)
	UOEH134(6)	2004年3月1日	5階医師控室(高層)
III	UOEH114(5)	2003年7月28日	貯湯槽給湯水(低層)
	UOEH117(5)	2003年7月28日	貯湯槽返湯水(低層)
	UOEH120(5)	2004年2月9日	4階共有スペース(高層)
	UOEH126(5)	2004年3月1日	4階共有スペース(高層)

\*試料採取年月日を分離年月日とした。



表5. 給湯水の昇温による給水、給湯水、灯油使用量の変化

	月別平均使用量(m <sup>3</sup> )				前年同期 補正比 <sup>c</sup>
	2002年度 4~7月 <sup>a</sup>	2003年度 4~7月 <sup>a</sup>	2002年度 8~3月 <sup>b</sup>	2003年度 8~3月 <sup>b</sup>	
灯油(給湯ボイラー)	11429	10719	13657	12143	0.889
灯油(病院全体)	264500	264000	336000	332000	0.988
給湯水(貯湯槽水)	2300	2157	2373	1967	0.829
給水(病院全体)	46279	45628	49603	46127	0.93

<sup>a</sup> 貯湯槽設定温度62℃、<sup>b</sup> 貯湯槽設定温度66℃、<sup>c</sup> 2002年度の4~7月期と2003年度の4~7月期の月別平均使用量が同じ(前年同期比が1)と仮定した場合の2002年度8~3月期と2003年度の8~3月期の前年同期比

*Legionella pneumophila* の細胞内増殖性に関与する新規遺伝子 *pmiA* の  
同定及び機能解析に関する研究

分担研究者 三宅 正紀 静岡県立大学 薬学部 微生物学教室

研究要旨

*Legionella pneumophila pmi* (protozoa and macrophage infectivity) 変異株 GB112 について、その性状及び変異遺伝子に関する詳細な解析を行った。GB112 株をヒト由来マクロファージ様細胞 U937 及び自由生活アメーバ *Acanthamoeba polyphaga* に感染させた場合の細胞内増殖性及び細胞毒性を調べた。いずれの宿主細胞に感染させた場合でも、親株である AA100 株感染時と比べ GB112 株の細胞内増殖性及び細胞毒性は低下し、特に *A. polyphaga* への感染性の低下が顕著であった。U937 感染系における細胞内小器官の輸送系を共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて解析したところ、GB112 株を取り込んだ細胞内小胞では、AA100 株の場合と比べ、後期エンドソーム-リソソームマーカー LAMP (lysosome-associated membrane glycoprotein) -1 及び LAMP-2 の局在がより顕著である (感染後 4 時間) のに対し、小胞体にとどまるためのシグナルであるペプチド配列 KDEL を有した蛋白質 (小胞体マーカー) の局在とは一致しなかった (感染後 6 時間)。さらにアメーバ感染系においてリソソーム酵素とその特異的基質の反応生成物の局在を透過型電子顕微鏡にて解析したところ、GB112 株を含む多くのファゴソーム内でこれらの局在が高率にみられた (感染後 6 時間)。従って、GB112 株は両宿主細胞に対して AA100 株とは異なる感染形態をとり、さらに感染初期の段階でのファゴソーム-リソソーム融合が両宿主内における増殖性低下の一因であることを明らかとした。

GB112 株の変異遺伝子解析を行ったところ、miniTn10::kan のゲノム上の挿入部位は 915bp からなる ORF (open reading frame) (ORF915) 内にあった。さらに、遺伝子相補試験によって、ORF915 のみで両宿主における細胞内増殖性及び細胞毒性が回復することが分かった。ORF915 は、他の如何なる細菌の既知遺伝子とも相同性を示さないことから、これを新規遺伝子 *pmiA* と命名した。また、数種のレジオネラ属菌種のゲノミックサザンブロッティングにより、*pmiA* は *L. pneumophila* 種特異的な遺伝子である可能性が示された。

*pmiA* がコードするアミノ酸配列からその機能蛋白質の二次構造予測を行ったところ、膜貫通型蛋白であることが推測された。そこで、同じく膜上で病原性発現に重要なエフェクター分子の宿主内送達に関与する Type IV 分泌装置を形成している蛋白質群 Icm (intracellular multiplication) /Dot (defect in organelle trafficking) との機能の異同を明らかにすべく、GB112 株及び *icm/dot* 変異株を用いて、赤血球に対する孔形成 (pore-forming) 活性及び NaCl 感受性の比較を行った。その結果、*icm/dot* 変異株の孔形成活性は AA100 株と比較して低いが、GB112 株も孔形成活性が低かった。一方、AA100 株を含む多くの *L. pneumophila* 病原株が NaCl 感受性であるのに対し、*icm/dot* 変異株は NaCl 耐性であるが、GB112 株は NaCl 感受性を示した。このため *PmiA* は、*Icm/Dot* とは異なる膜蛋白の機能を介して宿主細胞内での生存に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

*Legionella pneumophila* ゲノムへの mini-Tn10::kan 挿入により作製したアメーバ及びマクロファージ内の増殖性が低下した *pmi* 変異株 GB112 株について、その性状及び変異遺伝子に関する詳細な解析を行い、*L. pneumophila* の細胞内増殖性に関与する新たな菌体因子の同定及びその機能を明らかにすることを目的とした。

感染宿主モデルである U937 ヒトマクロファージ様細胞及び自然環境宿主モデルである

*Acanthamoeba polyphaga* を使い、GB112 株の両細胞における細胞内増殖性、細胞毒性を検証した。さらに、U937 細胞感染系において、LAMP や小胞体蛋白質に特異的にみられる KDEL 配列に対する特異的抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、GB112 株感染時の細胞内小器官のリクルートメントについて共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。また、*A. polyphaga* 感染系では、リソソーム蛋白である酸性ホスファターゼとその基質である  $\beta$ -glycerophosphate との反応生成物を透過型電子顕微鏡下で観察することにより、菌含有ファゴソームのリソソームとの融合について観察した。これら GB112 株の性状に起因する変異遺伝子を特定するため、mini-Tn10::kan 挿入部位の隣接領域について塩基配列解析を行い、得られた塩基配列情報と Legionella Genome Project のデータベースを利用して、GB112 株ゲノム上の変異遺伝子を同定した。さらに、その変異遺伝子の相補株を作製し、性状回復を確認することで GB112 株の性状に起因する遺伝子を決定した。また、同定した GB112 株の変異遺伝子が *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌種に存在するか否かをゲノミックサザンプロットングにより比較解析することで、当該遺伝子のレジオネラ属菌種内での普遍性について検討した。さらに *pmiA* のコードするアミノ酸配列から機能蛋白質の二次構造予測を行った。その結果、PmiA 蛋白質が膜蛋白質であることが予測されたことから、*L. pneumophila* の代表的な病原遺伝子群 *icm/dot* 変異株と GB112 株の孔形成活性及び NaCl 感受性を調べることで、膜蛋白質としての PmiA 及び Icm/Dot の細胞内増殖性に関連する機能について比較検討した。

## B. 研究方法

### 1. 使用菌株・細胞及び培養条件

*L. pneumophila* 各菌株は、必要に応じて適切な抗生物質を添加した CYE (charcoal yeast extract) 平板培地あるいは AYE (aces yeast extract) 液体培地中で培養した。ヒト由来マクロファージ様細胞 U937 は 10%ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum, FBS) 添加 RPMI1640 (RPMI1640-10%FBS) で、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下、PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) の添加によりマクロファージに分化誘導したものを実験に使用した。自由生活アメーバ *A. polyphaga* は PYG (protease peptone yeast extract glucose) 培地を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 2. GB112 株ゲノムへの mini-Tn10::kan 挿入及び *pmiA* の *Legionella* 属菌種における普遍性の確認

*Legionella* 属菌種各菌株のゲノム DNA を抽出し、プラスミド pB-3 (本項 7 参照)、あるいは pGB112C (本項 8 参照) をプローブに使用したサザンハイブリダイゼーションにより行なった。

### 3. *L. pneumophila* の細胞内増殖性試験

対数増殖後期まで培養した *L. pneumophila* 各菌株を、U937 細胞あるいは *A. polyphaga* に MOI (multiplicity of infection) =10、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下 1 時間感染させた。未感染の菌はゲンタマイシン処理により除去した。菌感染後それぞれ 0、4、24、48 時間培養後、感染細胞の破壊液を CYE 平板培地に接種し、37°C にて 3 日間培養後形成されたコロニー数を計測した。

### 4. *L. pneumophila* 感染による細胞毒性試験

U937 細胞に関しては、Alamar Blue (Biosource) を使用して行なった。*A. polyphaga* に関しては、トリパンブルーを使用して行なった。

### 5. 免疫蛍光染色による *L. pneumophila* 感染 U937 細胞における細胞内小器官リクルートメントの観察

細胞外の菌をウサギ抗 *L. pneumophila* ポリクローナル抗体及び Alexa546 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体、細胞内の菌を TO-PRO-3、細胞内小器官をマウス抗ヒト LAMP-1/LAMP-2 モノクローナル抗体あるいはマウス抗 KDEL モノクローナル抗体及び Alexa488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM-510) にて観察した。

6. 透過型電子顕微鏡による *L. pneumophila* 感染 *A. polyphaga* でのファゴソーム-リソソーム融合の観察  
感染細胞試料を固定後、酸性ホスファターゼの基質  $\beta$ -glycerolphosphate で処理した。再度固定後、エタノールで脱水処理を行い、Eponate 12 resin にて包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウラニル、クエン酸鉛で切片を染色後、Hitachi H-7000/STEM electron microscope (Hitachi) にて観察した。

#### 7. mini-Tn10::kan 挿入部位の塩基配列解析

mini-Tn10::kan の半領域とそれに隣接した GB112 株ゲノム領域をクローン化したプラスミド pB-3 を鋳型とし、T7 又は T3 プライマー及び Thermo Sequenase II dye terminator cycle sequencing kit (Amersham) を用いてサイクルシークエンス反応を行った。反応試料の泳動には、ABI 373A sequencer (Perkin Elmer) を使用した。泳動データは、data collection ソフトウェアを用いて収集し、analysis ソフトウェアで解析して塩基配列を決定した。この塩基配列情報を使い、コロンビアゲノムセンター Legionella Genome Project のデータベース上で Blast 検索を行い、決定した塩基配列と一致する遺伝子を検索した。

#### 8. GB112 相補株の作製

ORF915 (*pmiA*) 及びその上流プロモーター推定領域を pBC-SK<sup>+</sup>ベクターにクローニングした組換えプラスミド (pGB112C) を作製し、GB112 株へエレクトロポレーションにより導入した。得られた組換え体を GB112C-5 株とした。

#### 9. NaCl 感受性試験

OD<sub>550</sub>=1.0 に調整した *L. pneumophila* 各菌株培養液を、CYE 平板培地及び 0.6% NaCl 含有 CYE 平板培地に接種し、37°C にて培養した。発育したコロニー数を計測し、NaCl 感受性を評価した。

#### 10. 接触依存性赤血球溶血試験

羊赤血球 (sheep red blood cells, sRBCs) 溶液に *L. pneumophila* 各菌株培養液を加え、赤血球と菌を 2 時間接触させた。上清中のヘモグロビンを OD<sub>415</sub> で測定することにより、各菌株溶血活性を評価した。

### C. 研究結果

#### 1. 細胞毒性及び細胞内増殖性

GB112 株の U937 細胞及び *A. polyphaga* に対する細胞毒性に関して、両細胞に対して野生株 AA100 が 85% 以上の細胞毒性を示すのに対して、GB112 株は 20% 以下の値を示し、著しい細胞毒性の低下が見られた。また、GB112 株の細胞内増殖性に関して、U937 細胞においては、野生株と比較して大きな増殖性の低下は見られず、感染後 24 時間から 48 時間でも約 1/10 程度の低下にとどまった。しかしながら、*A. polyphaga* においては、感染後 4 時間の時点ですでに極端な菌数減少が起こり、感染後 24 時間で完全に殺菌された。

#### 2. *L. pneumophila* 感染 U937 細胞の細胞内小器官リクルートメントについて

U937 細胞内の GB112 株を含むファゴソームには、LAMP-1 及び LAMP-2 のシグナルが高率に見られた (感染 4 時間後) 一方、KDEL シグナルが局在する割合は野生株の場合と比較して低かった (感染 6 時間後)。よって、U937 細胞における GB112 株含有ファゴソームでは、感染初期にリソソームとの融合が起こり、野生株感染時に見られる小胞体の共局在が起こる割合は低いことが示唆された。

#### 3. *L. pneumophila* 感染 *A. polyphaga* におけるファゴソーム-リソソーム融合

*A. polyphaga* 感染における GB112 株を含むファゴソーム内のリソソーム酵素酸性ホスファターゼの局在を評価したところ、ファゴソームの酵素含有率が著しく高いことがわかった (感染 6 時間後)。よって、*A. polyphaga* の GB112 株含有ファゴソームも、感染初期にリソソームとの融合が起こることが明らかとなった。