

図3 診断方法の内訳 陽性結果のみ N=29

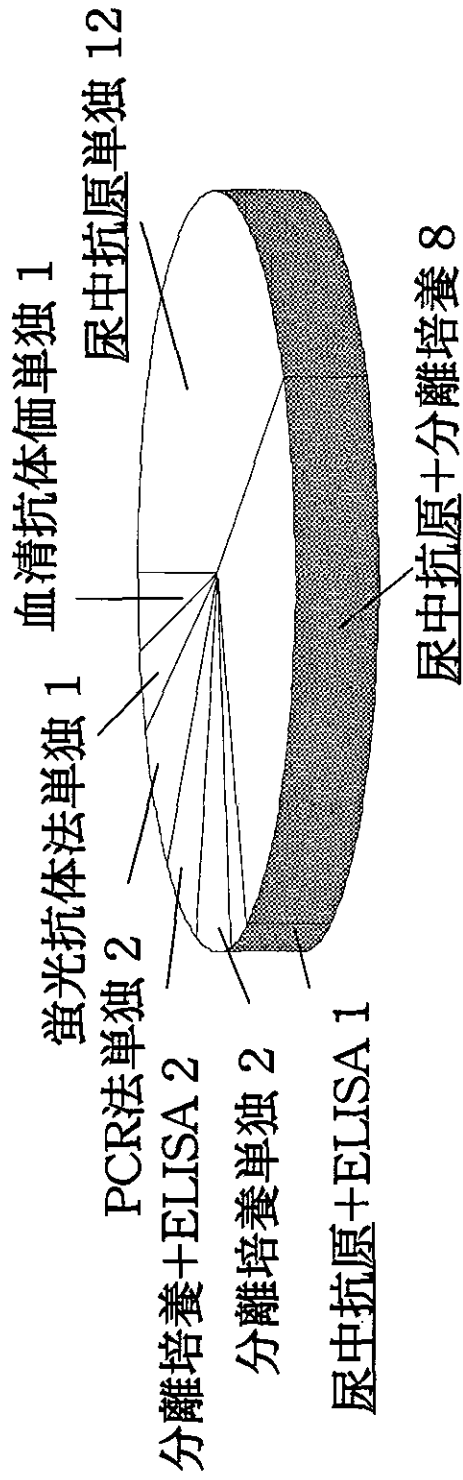
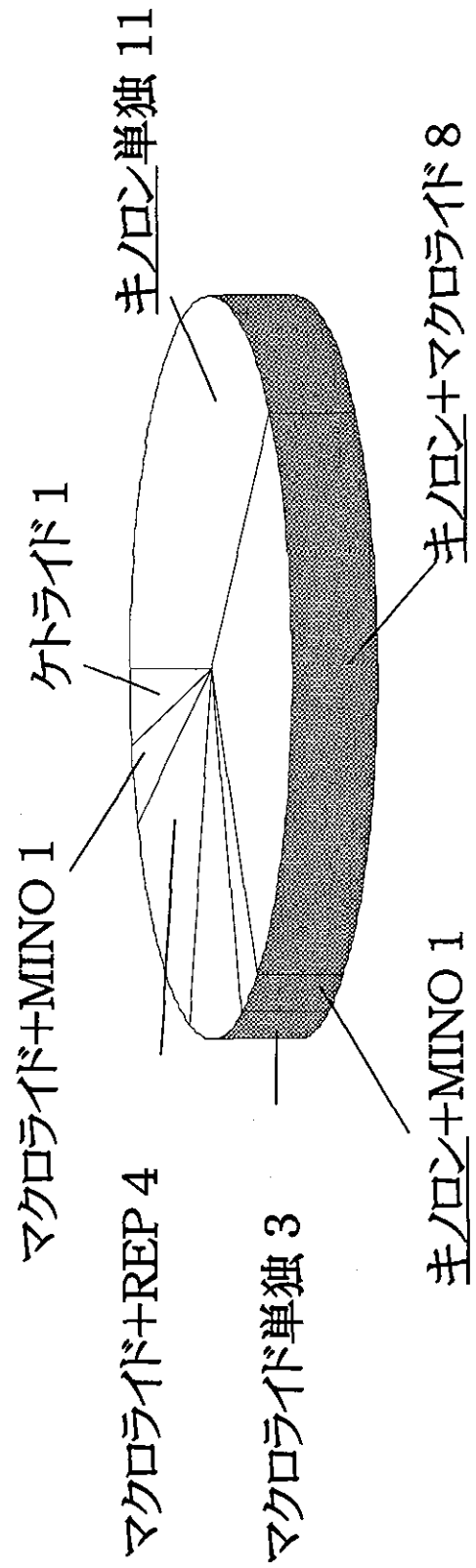


図4 治療薬の内訳 N=29



レジオネラ感染症の臨床疫学的診断法の開発に関する研究  
－特に集団感染事例を対象とした解析－

分担研究者

佐賀大学医学部臨床検査医学講座 青木洋介

研究要旨

レジオネラ属菌の集団感染（曝露）事例において、患者情報のみによるレジオネラ感染症診断確定度の客観的層別化を行うことは個々の患者診療および医療行政的対応において必要である。本研究はレジオネラ汚染源に曝露された集団において、レジオネラ尿中抗原検出などの精密検査を行う以前の「レジオネラ感染症の検査前確率」を定量的に定めることを目的とする。

A：研究目的

平成14年7月に宮崎県H市の循環式温泉施設においてレジオネラ集団感染が発生した。曝露を受けた来客者総数は19,773名におよび、このうちレジオネラ肺炎を疑う患者（曝露後2週間以内に症状が出現し、胸部レントゲン写真でレジオネラ肺炎に矛盾しない肺炎像を認める）は77名であった。当施設浴槽の温泉水からは最高で1,500,000 cfu/dlの濃度のレジオネラ属菌が検出されており、施設利用客1,300名を対象に施設管理不備の責任を追究する補償交渉が行われた<sup>1, 2)</sup>。

レジオネラ肺炎の市中散发例についてはレジオネラ属菌検出を目的とした特異的培養や尿中抗原検査などの特殊検査が確定診断のために必要であるが、冒頭に紹介したようなレジオネラ症集団感染事例が発生した場合には、まずレジオネラ感染症の疑いがある個人を適確に認識することを可能とする定量的診断法が必要となる。このような診断法は個々の被曝露者において血液検査や胸部X線検査を含む種々の医療行為を行う必要性の有無についての正当な根拠、即ち検査前診断確率を提供することができると考えられる。「本感染症の一定のリスク（レジオネラ汚染源への集団的曝露）を負う集団の健康被害状況の層別化」を検討する場合には疫学調査に基づくデータの臨床疫学的解析とその応用が必要と考え本研究を行った。

B．研究方法

宮崎県H市におけるレジオネラ集団感染事例の調査報告<sup>1)</sup>に基づき、臨床疫学的診断に必要な因子のレジオネラ感染症診断寄与度について解析を行った。今回、解析対象とした因子は、1) 発熱(38℃以上)、2) 喫煙歴の有無(男女別; 過去喫煙歴を含む)、3) 基礎疾患の有無(男性のみ; 自己免疫疾患, 糖尿病, 悪性腫瘍, 臓器移植, 人工透析, 甲状腺機能以上, 免疫抑制剤使用)、4) 飲酒歴の有無(女性のみ)の4項目を含んだ。レジオネ

ラ感染症疑い“あり”(患者)，“なし”(対照者)の両群におけるこれら4項目の各個体数から4項目の感度・特異度，および陽性尤度(LR+ : Positive likelihood ratio, 検査陽性の場合のレジオネラ肺炎である確からしき)と陰性尤度(LR- : Negative likelihood ratio, 検査陰性の場合のレジオネラ肺炎である確からしき)を算出した。4項目複数因子の有無別によるレジオネラ感染症の定量的診断(確率)は求められた各尤度の積による結合尤度比<sup>3)</sup>から算出した。Odds (O)と確率(P)の間には、 $P = Odds / (1 + Odds)$ という換算式が成り立つため(Oddsが1であることはその事象に該当する確率は50%である)，この式より結合尤度比を確率に変換した。

### C. 研究結果

宮崎医科大学(現・宮崎大学医学部)公衆衛生学教室の加藤らの調査報告内容より求められた，発熱，喫煙歴あり，基礎疾患あり(男性のみ)，飲酒歴あり(女性のみ)，のそれぞれの臨床項目のレジオネラ感染症(疑い事例を含む)診断に対する感度および特異度の近似値を表1に示す。発熱の本感染症診断に対する特異度は報告内容からは算出できないため，便宜的に50%という数値を用いた。これは，レジオネラ汚染源曝露から2週間以内の発熱はレジオネラ感染症による確率と，それ以外の原因による発熱である確率が同程度であると仮定することを意味する。これらの値から各項目が陽性である場合，および陰性である場合に本感染症疑い事例に該当する確からしき(尤度)を求めてみると，喫煙歴の陽性尤度1.72，陰性尤度0.28，以下，喫煙歴あり(男性)は1.25，0.56，喫煙歴あり(女性)は2.71，0.87，基礎疾患あり(男性)は2.66，0.89，飲酒歴あり(女性)は4.83，0.75という結果になった(表1)。女性における基礎疾患(あり)，および男性における飲酒歴(あり)は，加藤らの報告では本感染症の有意なリスク因子ではないため今回の解析には含んでいない。この結果を基に，各項目の存在する種々の事例を想定した場合のレジオネラ感染症疑い事例である検査前確率は以下ようになる。

例1) 発熱あり，喫煙歴あり，基礎疾患あり，の男性：

結合尤度比 $= 1.72 \times 1.25 \times 2.66 = 5.72$ ，従って本感染症疑い例である確率 $= [5.72 / (1+5.72)] \times 100 = 85\%$

例2) 発熱あり，喫煙歴あり，基礎疾患なし，の男性：

結合尤度比 $= 1.72 \times 1.25 \times 0.89 = 1.91$ ，従って本感染症疑い例である確率 $= [1.91 / (1+1.91)] \times 100 = 65\%$

例3) 発熱なし，喫煙歴あり，疾患なし，の男性：

結合尤度比 $= 0.28 \times 1.25 \times 0.89 = 0.31$ ，従って本感染症疑い例である確率 $= [0.31 / (1+0.31)] \times 100 = 23\%$

例4) 発熱なし，喫煙歴なし，基礎疾患なし，の男性：

結合尤度比 $= 0.28 \times 0.56 \times 0.89 = 0.14$ ，従って本感染症疑い例である確率 $= [0.13 / (1+0.13)] \times 100 = 12\%$

例 5) 発熱あり, 喫煙歴あり, 飲酒歴あり, の女性:

結合尤度比 =  $1.72 \times 2.71 \times 4.83 = 22.5$ , 従って本感染症疑い例である確率 =  $[22.5 / (1+22.5)] \times 100 = 96\%$

例 6) 発熱あり, 喫煙歴あり, 飲酒歴なし, の女性:

結合尤度比 =  $1.72 \times 2.71 \times 0.75 = 3.50$ , 従って本感染症疑い例である確率 =  $[3.50 / (1+3.50)] \times 100 = 77\%$

例 7) 発熱あり, 喫煙歴なし, 飲酒歴あり, の女性

結合尤度比 =  $1.72 \times 0.87 \times 4.83 = 7.22$ , 従って本感染症疑い例である確率 =  $[7.22 / (1+7.22)] \times 100 = 87\%$

例 8) 発熱なし, 喫煙歴なし, 飲酒歴なし, の女性:

結合尤度比 =  $0.28 \times 0.87 \times 0.75 = 0.18$ , 従って本感染症疑い例である確率 =  $[0.18 / (1+0.18)] \times 100 = 15\%$

#### D. 考察

感度および特異度から尤度比を算出し診断確率を定量的に求める方法は「特定の所見を有する患者での疾患の可能性は, 同じ疾患を有する者のうち特定の所見を有する (あるいは有しない) 者の割合から推定される」という Bayes 解析の技法を応用したものである<sup>4)</sup>。結合尤度比による疾患確率への言及には, 診断基準として用いる各項目 (検査) が陽性である可能性が他の項目 (検査) が陽性になる確率によって影響を受けないことが前提となる<sup>5)</sup>。今回の検討でレジオネラ感染症疑い例の定量的検出に用いた 4 項目 (発熱, 喫煙歴, 基礎疾患, 飲酒歴) は互いに独立していると考えて矛盾しない。

喫煙歴 (女性), 飲酒歴 (女性), 基礎疾患 (男性), のように特異度が高い診断項目 (表 1) は, 対象疾患 (本研究ではレジオネラ感染症) であることを医師が肯定 (rule in) したい場合には有用な検査であるため, 汚染源曝露者からレジオネラ感染症の疑い例を広く拾い上げることが必要な場合には有用な診断項目 (diagnostic clue) であると思われる。

今回の臨床疫学的観点からの検討は, レジオネラ汚染源への集団曝露例を対象としたものであるため, 「肺炎であればレジオネラ肺炎である可能性が極めて高い集団」に対してのみ今回の検討結果が応用できることに留意せねばならない。

#### F. 結論

宮城県 H 市における集団感染事例の調査報告書をもとに, 集団感染例を対象 population とした場合のレジオネラ感染症疑い例の客観的抽出に有用であると思われる患者臨床情報の尤度について検討を行った。今後は, 有症状者の記録を用いて今回の診断確率の求め方が妥当であるかを確認する作業が必要であると思われる。

市中肺炎重症例におけるレジオネラ感染症の診断を目的として, Bayes 解析を用いた診断指針が作成できれば本市中感染症の有用な診断 tool を提供することになると考えられる。

この課題については本厚生労働省科学研究の分担研究である「レジオネラ感染症の診断・治療マニュアルの改訂：分担研究者 田口善夫」の検討結果をふまえ、Bayes 解析を用いた臨床疫学的診断指針について検討する予定である（平成17年度継続研究課題）。

**F. 健康危機管理情報**

該当事項なし

**G. 研究発表（論文発表，学会発表）**

平成16年度なし

**H. 知的財産権の出願・登録**

該当事項なし

**参考文献**

1. 加藤貴彦, 他. レジオネラ発症に関する個体・環境要因のリスク解析. 平成14年度厚生労働省科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）「室内空気中の微生物防止対策に関する研究」－レジオネラ症集団感染事例の疫学調査部会報告書 財団法人ビル管理教育センター 55－69, 2002.
2. 松元信弘. 循環式温泉入浴施設を感染源としたレジオネラ肺炎の画像所見ならびに臨床像の検討. Bayer RTI Symposium, 2004.
3. Thomas CC. Likelihood and odds. In: Lusted LB. Introduction to medical decision making. Springfield, Ill. 20－23, 1968.
4. Pauker SG, Kopelman RI. Interpreting hoofbeats: Can Bayes help clear the haze? New Eng J Med, 327: 1009－1013, 1992.
5. Feinstein AR. Clinical biostatistics. XXXIX. The haze of Bayes, the aerial palaces of decision analysis, and the computerized Ouija board. Clin Pharmacol Ther, 21: 482－496, 1997.

表 1 : 各種臨床的 parameter のレジオネラ感染症 a) の診断的特性

|             | 感 度  | 特異度     | LR (+) b) | LR (-) c) |
|-------------|------|---------|-----------|-----------|
| 発熱 (38°C以上) | 86 % | 50 % d) | 1.72      | 0.28      |
| 喫煙歴あり       |      |         |           |           |
| 男性          | 79 % | 37 %    | 1.25      | 0.56      |
| 女性          | 19 % | 93 %    | 2.71      | 0.87      |
| 基礎疾患あり (男性) | 16 % | 94 %    | 2.66      | 0.89      |
| 飲酒歴あり (女性)  | 29 % | 94 %    | 4.83      | 0.75      |

- a) 疑い例を含む (入浴より 2 週間以内に症状が出現し, 胸部 X 線写真でレジオネラ肺炎に矛盾しない肺炎像を認める)
- b) LR (+) = Positive likelihood ratio : 感度 / 1 - 特異度
- c) LR (-) = Negative likelihood ratio : 1 - 感度 / 特異度
- d) 発熱の特異度は便宜的に 50 % に設定した (本文, 研究方法を参照)

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

- 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)
- 7) 宮本比呂志, 瓜生佳世, 吉村博子, 谷口初美  
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.
- 8) 宮本比呂志, 池野貴子, 吉村博子, 谷口初美, 松本哲朗  
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.
- 9) 宮本比呂志, 吉田真一



レジオネラの病原性発現機構

Mebio 2004; 21(12): 63-68.

1 0) Irie M, Miyamoto H, Ikeda M, and Yoshida S.

A 3-year follow-up study of anti-Legionella antibodies in users of Japanese 24-hour hot water baths. J. Occup. Health 46:68-77, 2004.

1 1) Seki M, Iida K, Saito M, Nakayama H, and Yosida S.

Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate. J. Bacteriol. 186(7):2046-2051, 2004

1 2) Ohnishi H, Mizunoe Y, takade A, Tanaka Y, Miyamoto H, harada M, and Yoshida S:

Legionella dumoffii DjlA, a member of the DnaJ family, is required for intracellular growth. Infect. Immun. 72: 3592-3603, 2004

1 3) Kajiwara H, Saito M, Ohga S, Uenotsuchi T, and Yoshida S:

Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. Infect. Immun. 72: 5073-5079, 2004

1 4) Miyake M., Fukui F., Imai Y.

Immediate cessation of protein synthesis in *Legionella pneumophila* avirulent strains at an early stage of infection in macrophage and amoebae. (2005) Microbes Infect. (submitted)

1 5) Miyake M., Watanabe T., Koike H., Molmeret M., Imai Y., Abu Kwaik Y.

Characterization of *Legionella pneumophila* *pmiA*, an essential gene for infectivity to protozoa and macrophages. (2005) Infect. Immun. (submitted)

1 6) 江崎孝行

ゲノム情報を使った感染症の網羅的診断法。微生物はなぜ病気をおこすのか。日本細菌学会 クバプロ。 2004. 187-195.

1 7) 江崎孝行, 大楠清文, 河村好章.

DNA マイクロアレイを用いた環境サンプル中の微生物群集の解析.

難培養微生物研究. 最新技術. 工藤俊章, 大熊盛也 (監修), シーエムシー出版  
(東京), p94-100, 2004

18) 江崎孝行, Yuing Li, 大楠清文, 河村好章.  
呼吸器感染症の網羅的診断に向けて  
分子呼吸器病. 8:341-344. 2004

19) 大楠清文, 江崎孝行.  
これからの微生物検査 遺伝子検査  
臨床と微生物. 31:610-622, 2004.

20) 江崎孝行, 大楠清文  
細菌の迅速診断システム  
日本臨床 62 (12): 2276—2280, 2004

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

##### 1. レジオネラの生態に関する研究

〈原 著〉

## 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

古畑 勝則<sup>1)</sup>・宮本比呂志<sup>2)</sup>・福山 正文<sup>1)</sup>

### *Isolation of Legionella spp. from Potting Soils, and The Growth within Acanthamoeba sp. and Antibiotics Susceptibility of Isolates*

Katsunori FURUHATA<sup>1)</sup>, Hiroshi MIYAMOTO<sup>2)</sup>, Masafumi FUKUYAMA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Microbiology, School of Environmental Health, Azabu University

<sup>2)</sup>Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Occupational and Environmental Health

#### 要 旨

市販園芸用土におけるレジオネラ属の生息状況を把握するために112試料について分離を試みたところ、11試料(9.8%)から分離され、低率ながら生息していることが判明した。また、これらの試料を室温で放置した場合は6ヵ月経過後でも分離され、長期にわたって生残することが確認できた。分離菌種は *L. pneumophila* が優占種であり、血清群別では6群、1群、3群が比較的高頻度で分離された。これら分離株はいずれも *Acanthamoeba* 内で増殖可能であったことから病原性を有すると考えられた。また、分離株の薬剤感受性試験では、rifampicin の MIC<sub>90</sub> が 0.125 µg/mL と最も感受性が高かったが、minocycline は 32 µg/mL, piperacillin は >256 µg/mL と MIC 値が高い傾向がみられた。

Key words : レジオネラ属, 園芸用土, 細胞内増殖性, 薬剤感受性

#### はじめに

近年、我が国においてもレジオネラ症の院内感染例や温泉地での集団感染例が相次いで報告され<sup>1,2)</sup>、大きな社会問題となっている。厚生労働省は「新版レジオネラ症防止指針」<sup>3)</sup>を刊行し、汚染対策に関して全国的に啓蒙を進めている。

レジオネラ症は呼吸器系の感染症であるからレジオネラ属を含むエアロゾルを吸入することによって感染が成立するものと考えられている<sup>3)</sup>。したがって、エアロゾルが飛散する空調用冷却塔などの人工的な水環境が感染源として指摘されており、このほか、給湯水、修景用水、循環式浴槽水、温泉水などの水環境からもレジオネラ属が分離されている<sup>4)</sup>。

ところで、レジオネラ属は元来土壌細菌であるといわれ、広く自然界に生息しているものと考えられてきた<sup>3)</sup>。著者らはこれまでに全国の土壌からレジオネラ属

の分離を試み、全国各地の土壌に生息していることを報告した<sup>5)</sup>。こうした土壌中のレジオネラ属が直接レジオネラ症の感染源になることは希であるが、園芸用土が感染源になることはすでに知られており<sup>6)</sup>、我が国においても発症例が報告されている<sup>7)</sup>。

最近、都心部を中心にガーデニングの流行から多種類の園芸用土が市販されるようになり、頻繁に利用されている。しかしながら、こうした用土におけるレジオネラ属の生息状況はあまり調査されておらず、不明な点が多い。

そこで今回は、市販園芸用土に分布するレジオネラ属の菌種構成を明らかにするために分離を試み、また併せて分離株のアメーバ内増殖性と薬剤感受性についても検討した。

#### 材料および方法

##### 1. 供試試料

2002年5月から10月にかけて関東地方で購入した各種園芸用土112試料を実験に供した。また、レジオ

<sup>1)</sup>麻布大学環境保健学部微生物学, <sup>2)</sup>産業医科大学医学部微生物学

ネラ属が分離された試料はそのまま室温に放置し、3ヵ月経過後と6ヵ月経過後に再び分離を試みた。

## 2. レジオネラ属の分離および同定

供試試料 50 g を 200 mL のコルベンに入れ、これに蒸留水を 100 mL 加えて十分に混和後、あらかじめ PYGC 培地<sup>8)</sup>で 30°C、7 日間培養しておいた *Acanthamoeba* (JAC/E1 株) 浮遊液 0.5 mL を添加して 36°C で 4 週間放置し、レジオネラ属を増菌した。続いて、4 週間増菌後に十分攪拌してから上清 1 mL を小試験管に取り、これに 0.2 M HCl-KCl 溶液 (pH 2.2) を同量加えて混和後、15 分間接触させた。これを WYO $\alpha$  寒天培地 (栄研化学) と GVP $\alpha$  寒天培地 (日研生物医学研究所) にそれぞれ 0.1 mL ずつ滴下して培地全面にコンラージ棒で塗抹し、36°C で 7 日間培養した。培養後、レジオネラ属を疑う集落を数個ずつ釣菌して、血液寒天培地と BCYE $\alpha$  寒天培地の 2 分割平板培地 (日研生物医学研究所) に塗抹し、純培養と同時にシステイン要求性試験を行った。さらに、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についてグラム染色を行い、グラム陰性の長桿菌が確認されたものをレジオネラ属と推定した。次に、ラテックス凝集反応 (OXOID)、免疫血清凝集反応 (デンカ生研) および DNA-DNA ハイブリダイゼーション (極東製薬) により菌種の同定を行った。

## 3. アメーバ内増殖性試験

アメーバ内増殖性試験は、分離菌株 29 株を用い、宮本らによって考案されたアメーバ寒天法<sup>9)</sup>に準拠して行った。すなわち、BCYE $\alpha$  寒天培地 (日研生物医学研究所) の表面を十分に乾かした後、これに PYGC 培地<sup>8)</sup>で 30°C 7 日間培養した *Acanthamoeba* 液を 3 mL 滴下し、培地表面全体に塗抹した。その後、30°C で 3 時間静置し、アメーバを寒天平板に十分に付着させた後、余分な PYGC 培地を除去した。この培地 (以下、アメーバ寒天培地) と BCYE $\alpha$  寒天培地の両者に試料を同時に塗抹し、30°C で 7 日間培養した。これら両培地でコロニー形成が観察された試料はアメーバ内増殖性を有するものと判断した。さらに、コロニーを形成した試料を *Acanthamoeba* 液に接種して 18 時間感染させた後、ヒメネス染色を行い、アメーバ内で増殖したレジオネラ属を観察して細胞内増殖能を確認した。なお、陽性コントロールには臨床分離株である *L. pneumophila* Nagasaki 80045 株、陰性コントロールには弱毒株である *L. pneumophila* 25D 株<sup>10)</sup>をそれぞれ用いた。

## 4. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は Etest (AB BIODISK, アスカ純薬) を用いて添付の technical guide に従って行った。

供試抗菌剤はマクロライド系として erythromycin (EM), clarithromycin (CAM), azithromycin (AZM),

テトラサイクリン系として minocycline (MINO), ニューキノロン系として levofloxacin (LVFX), sparfloxacin (SPFX),  $\beta$ -ラクタム系として piperacillin (PIPC), imipenem (IPM), アミノグリコシド系として gentamicin (GM), および抗結核薬である rifampicin (RFP) の計 10 薬剤を用いた。

BCYE $\alpha$  寒天培地 (日研生物医学研究所) で分離株を 2 日間前培養後、菌苔をかき取り滅菌生理食塩水中に浮遊させ、McFarland No. 1 となるように菌液を調製した。この菌液 0.5 mL を BCYE $\alpha$  寒天培地 (直径 150 mm シャーレ (Greiner) に 60 mL ずつ分注したもの) に滴下し、コンラージ棒で全面に塗抹後、Etest のストリップを培地上に密着させ、36°C で 3 日から最長 5 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。

## 結 果

### 1. レジオネラ属の分離状況

市販園芸用土からのレジオネラ属の分離状況を用土別に表 1 に示した。全体では 112 試料中 11 試料 (9.8%) から分離され、分離率は低いもののレジオネラ属は園芸用土にも生息していることが明らかになった。用土の種類別では、殺菌剤不含の培養土が 39 試料中 9 試料 (23.1%) と最も多く、次いで腐葉土が 13 試料中 2 試料 (15.4%) であった。しかし、殺菌剤含有の培養土や鹿沼土・赤玉土、自然土、ピートモス・パーライトなどの土壌改良剤からは 1 例も分離されなかった。

また、表 2 にはレジオネラ属が分離された 11 試料を室温に放置し、3ヵ月後と6ヵ月後に再び分離を試みた成績を示した。11 試料のうち 7 試料 (63.6%) から 3ヵ月経過後からもレジオネラ属が分離されたが、4 試料からは分離されなかった。さらに、6ヵ月経過後の試料でも 3ヵ月後に分離された試料と同一の 7 試料 (63.6%) からレジオネラ属が分離された。分離菌種を試料別にみると、6ヵ月経過後でも初回に分離された *L. pneumophila* 血清群と同じ血清群が分離された試料が 3 試料あった。

表 1 園芸用土からのレジオネラ属の分離状況

| 供試試料         | 検査例数 | 陽性例数 (%)  |
|--------------|------|-----------|
| 培養土 (殺菌剤不含)  | 39   | 9 (23.1)  |
| 培養土 (殺菌剤含有)  | 22   | 0 ( 0)    |
| 鹿沼土 (赤玉土を含む) | 17   | 0 ( 0)    |
| 自然土          | 14   | 0 ( 0)    |
| 腐葉土          | 13   | 2 (15.4)  |
| 土壌改良剤        | 7    | 0 ( 0)    |
| 合 計          | 112  | 11 ( 9.8) |

表2 園芸用土からのレジオネラ属の経時的分離状況

| 供試試料<br>No. | 検査時期  |   |   |
|-------------|---|---|---|
|             | 初回  | 3カ月後  | 6カ月後  |
| 34          | <i>L. pneumophila</i> 6群  | <i>L. pneumophila</i> 13群   | <i>L. pneumophila</i> 1群<br><i>L. pneumophila</i> 6群<br><i>L. pneumophila</i> 13群<br><i>L. micdadei</i> |
| 38          | <i>L. pneumophila</i> 10群   | <i>L. pneumophila</i> 6群<br><i>L. pneumophila</i> 10群                             | <i>L. pneumophila</i> 1群<br><i>L. pneumophila</i> 6群  |
| 42          | <i>L. pneumophila</i> 3群  | <i>L. pneumophila</i> 6群  | <i>L. pneumophila</i> 6群  |
| 63          | <i>L. jordanis</i>  | 不検出   | 不検出   |
| 64          | <i>L. pneumophila</i> 10群   | 不検出   | 不検出   |
| 70          | <i>L. pneumophila</i> 1群  | <i>L. pneumophila</i> 1群<br><i>L. pneumophila</i> 6群<br><i>L. pneumophila</i> 12群 | <i>L. pneumophila</i> 1群<br><i>L. pneumophila</i> 4群<br><i>L. pneumophila</i> 12群                       |
| 73          | <i>L. pneumophila</i> 3群  | 不検出   | 不検出   |
| 74          | <i>L. pneumophila</i> 1群  | <i>L. pneumophila</i> 3群<br><i>L. pneumophila</i> 6群<br><i>Legionella</i> sp.     | <i>L. pneumophila</i> 6群  |
| 87          | <i>Legionella</i> sp.   | 不検出   | 不検出   |
| 93          | <i>L. pneumophila</i> 1群<br><i>L. pneumophila</i> 3群<br><i>Legionella</i> sp. | <i>L. pneumophila</i> 1群<br><i>L. pneumophila</i> 3群                              | <i>L. pneumophila</i> 1群<br><i>L. bozemanii</i>   |
| 94          | <i>L. pneumophila</i> 3群<br><i>L. pneumophila</i> 6群<br><i>Legionella</i> sp. | <i>L. pneumophila</i> 3群  | <i>L. micdadei</i>  |

表3 園芸用土から分離されたレジオネラ属

| 分離菌種                  | 分離例数(%) |
|-----------------------|---------|
| <i>L. pneumophila</i> |         |
| 血清群1群                 | 5(17.2) |
| 3群                    | 5(17.2) |
| 4群                    | 1(3.4)  |
| 6群                    | 6(20.7) |
| 10群                   | 2(6.9)  |
| 12群                   | 1(3.4)  |
| 13群                   | 1(3.4)  |
| <i>L. bozemanii</i>   | 1(3.4)  |
| <i>L. micdadei</i>    | 2(6.9)  |
| <i>L. jordanis</i>    | 1(3.4)  |
| Others                | 4(13.8) |
| 合計                    | 29(100) |

表3には経時的に分離されたレジオネラ属を含めた同定結果を示した。最も高頻度に分離された菌種は *L. pneumophila* で、全体の72.4%を占めた。なかでも血清群6群が6株(20.7%)と最も多く、次に1群と3群がそれぞれ5株(17.2%)、10群が2株(6.9%)、4群、

12群、13群が各1株(3.4%)であった。*L. pneumophila* 以外の菌種では *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. jordanis* が各1株ずつ分離された。

2. 分離株のアメーバ内増殖性

園芸用土から分離した29株のレジオネラ属は、図1に示した陽性コントロールと同様にアメーバ寒天培地上でも集落を形成し、対照として用いたBCYE $\alpha$ 寒天培地上の集落となら差は認められなかった。従って、これらの菌株はいずれも *Acanthamoeba* の細胞内で増殖したものと考えられた。このことはレジオネラ属をアメーバに感染させた後のヒメネス染色によっても細胞内での存在が明瞭に確認された。

3. 分離株の薬剤感受性

園芸用土から分離した29株の10抗菌剤に対するMIC分布を表4に示した。MIC分布について、EMでは0.5~2  $\mu$ g/mL, CAMでは1~2  $\mu$ g/mL, AZMでは0.25~2  $\mu$ g/mL, MINOでは2~32  $\mu$ g/mL, LVFXでは0.25~1  $\mu$ g/mL, SPFXでは0.25~4  $\mu$ g/mL, IPMでは0.008~2  $\mu$ g/mL, GMでは0.5~4  $\mu$ g/mL, RFPでは0.016~0.25  $\mu$ g/mLにそれぞれ分布した。供試した10薬剤中9薬剤が一峰性のピークを示したが、PIPCでは

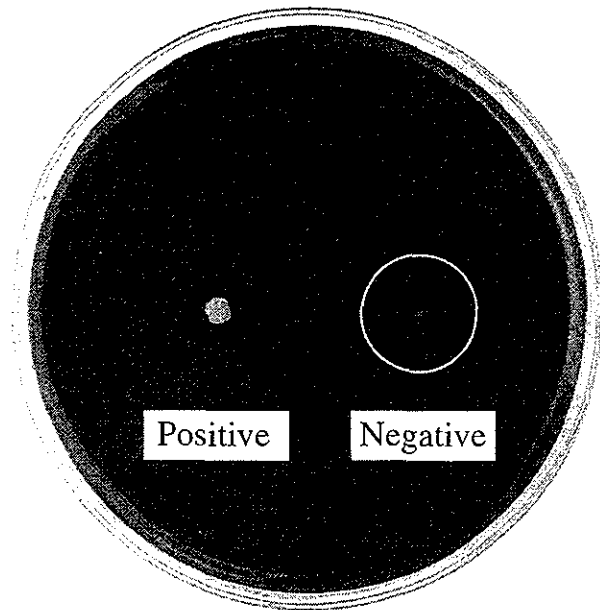


図1 アメーバ寒天法による細胞内増殖性試験  
 左：陽性コントロール NAGASAKI 80045 株  
 右：陰性コントロール 25D 株

表4 園芸用土由来レジオネラ属分離株の薬剤感受性

| 供試薬剤           | MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) |                   |                   |
|----------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|
|                | 範囲                              | MIC <sub>50</sub> | MIC <sub>90</sub> |
| Erythromycin   | 0.5-2                           | 1                 | 2                 |
| Clarithromycin | 1-2                             | 2                 | 2                 |
| Azithromycin   | 0.25-2                          | 1                 | 1                 |
| Minocycline    | 2-32                            | 16                | 32                |
| Levofloxacin   | 0.25-1                          | 0.5               | 0.5               |
| Sparfloxacin   | 0.25-4                          | 0.5               | 2                 |
| Piperacillin   | 0.032->256                      | 16                | >256              |
| Imipenem       | 0.008-2                         | 0.125             | 1                 |
| Gentamicin     | 0.5-4                           | 2                 | 2                 |
| Rifampicin     | 0.016-0.25                      | 0.125             | 0.125             |

n=29

0.032~>256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と幅広い分布域を示した。また、供試抗菌剤のうち、MINO では 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上に 14 株 (50%)、PIPC では >256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に 4 株 (14.3%) 認められた。

各抗菌剤における MIC<sub>50</sub> と MIC<sub>90</sub> は表 4 に示したとおりである。分離株について MIC<sub>90</sub> で比較すると、10 抗菌剤のうち、RFP は 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と最も感受性が高く、LVFX は 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AZM と IPM は 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、EM、CAM、SPFX および GM は 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。ところが、MINO は 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、PIPC は >256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。RFP と比較すると、LVFX と 2 管、AZM、IPM と 3 管、EM、CAM、SPFX および GM と 4 管、

MINO と 8 管および PIPC と 11 管以上の差があり、RFP に比べてそれぞれ劣っていた。

考 察

レジオネラ属のうち、園芸用土に関連したレジオネラ症の起原菌として注目されたのは 1980 年に米国で初めて発見された *L. longbeachae* である<sup>11)</sup>。近年、本菌による肺炎症例がオーストラリアで多く報告されている<sup>12)</sup>。なかでも Ruehleman と Crawford<sup>13)</sup> は、オーストラリアで発生した症例について造園の際に用いる腐葉土が感染源の一つであったと推察している。我が国においても、岡崎ら<sup>7)</sup>や山本ら<sup>14)</sup>によって *L. longbeachae* の症例が報告されている。

今回は市販の園芸用土を対象にレジオネラ属の分離を試みたところ、全体で 9.8% と低い分離率ではあったが、我が国の殺菌剤不含園芸用土にもレジオネラ属が生息していることが明らかとなった。一方、殺菌剤含有と表示された培養土からは 1 例も検出されなかったが、殺菌剤の種類や含有量はまったく不明であり、殺菌剤の効果かどうかは明らかではない。Koide らの調査結果<sup>15)</sup>では、直接法で 31.3%、増菌法では 68.8% から、Steele らがオーストラリアで調査した結果でも 73% と高率にレジオネラ属が分離されており<sup>16)</sup>、今回の成績に比べ 3~7 倍程度高い分離率であった。この差は検出法における増菌培養時間の相違によるものかもしれない。

既述したように、園芸用土に関しては *L. longbeachae* が重要視されているが、今回は 1 株も分離されず、優占種は *L. pneumophila* で、血清群別では 6 群、1 群、3 群が高頻度に分離された。Koide らの調査では、*L. bozemanii* のほか、*L. longbeachae* や *L. micdadei* が優占していた<sup>15)</sup>。Steele らはオーストラリアの園芸用土から最も高頻度に *L. longbeachae* を分離しており<sup>16)</sup>、今回の分離菌種とは異なっていた。オーストラリアではユーカリやサトウキビを原材料として腐葉土を作成していることから、腐葉土中のアメーバなどの微生物叢が我が国とは異なることが要因の一つと考えられた。また、今回は分離培養に先だって *Acanthamoeba* を用いた増菌培養を行ったため、これによって宿主親和性の高い *L. pneumophila* が優占して検出された可能性が高い。

また、Steele らの報告<sup>16)</sup>では、室温で保存した土壤中で *L. dumoffii* は 10 ヶ月間生残していた。著者らもレジオネラ属が分離された園芸用土を室温に放置し、経時的に分離したところ、6 ヶ月経過後でも最初と同一の菌種が分離され、レジオネラ属は園芸用土中で長期間生残可能であることが判明した。

園芸用土由来株の病原性を検討するために、*Acanthamoeba* を用いて分離株のアメーバ内増殖能を調べた。レジオネラ属は細菌補食性原生動物の細胞内でも増

殖する性質を持ち、このことがヒトや動物のマクロファージ内でも増殖できることと共通する。そして、この性質がレジオネラ属の病原性を考える上で最も重要であると言われている<sup>17)</sup>。今回、実験に供した園芸用土由来株はすべて *Acanthamoeba* 内で増殖可能であることが確認でき、分離株はすべて病原性を有する可能性が高いと考えられた。

これら分離株の薬剤感受性を検討したところ、rifampicin の MIC<sub>90</sub> が 0.125 と最も感受性が高かったが、臨床由来株の感受性<sup>18)</sup>と比較すると、4 管高い値であった。また、gentamicin を除く各抗菌剤では臨床由来株の MIC<sub>90</sub> よりいずれも 1 管から 5 管高い値を示し、全体的に臨床由来株よりも耐性である傾向がみられた。また、自然環境の土壌から分離したレジオネラ属の薬剤感受性<sup>19)</sup>との比較では類似した感受性パターンがみられたが、piperacillin と imipenem では 4 管から 5 管高い MIC<sub>90</sub> であった。

## 結 語

以上のように、レジオネラ属は市販の園芸用土にも低率ながら生息していることが判明した。また、室温で放置した場合は 6 ヶ月経過後も分離され、長期にわたって生残することが確認できた。分離菌種は *L. pneumophila* が優占種であり、いずれの分離株も *Acanthamoeba* 内で増殖可能であったことから、病原性を有すると推察された。これら分離株の薬剤感受性試験では、minocycline や piperacillin に MIC 値の高い株がみられることから、今後継続して監視する必要があると考えられた。

なお、本研究は平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金(研究課題名: 生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究, No. 15222301)の支援を受けて行われた。

## 文 献

- 1) 国立感染症研究所: レジオネラ症. 病原微生物検出情報 2000; 21: 186-93.
- 2) 国立感染症研究所: レジオネラ症. 病原微生物検出情報 2003; 24: 27-36.
- 3) ビル管理教育センター: 新版レジオネラ症防止指針. 厚生省生活衛生局企画課監修, ビル管理教育センター, 東京, 1999.
- 4) 古畑勝則: 水環境におけるレジオネラ属菌の汚染と制御. 日食雑誌 1998; 15(1): 1-9.

- 5) 古畑勝則, 岡部弥穂, 堂ヶ崎知格, 原 元宣, 福山正文: 土壌からのレジオネラ属菌の分離状況. 防衛防衛誌 2002; 30(9): 555-61.
- 6) Duchin JS, Koehler J, Kobayashi JM, Rakita RM, Olson K, Hampson NB, et al.: Legionnaires' disease associated with potting soil -California, Oregon, and Washington, May-June 2000. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 2000; 49(34): 777-8.
- 7) 岡崎美樹, 小出道夫, 齊藤 厚: 造園業者に発症した *Legionella longbeachae* 肺炎の 1 例. 感染症誌 1998; 72(10): 1076-9.
- 8) 石井圭一: アメーバ無菌培養液. アメーバ図鑑, 金原出版, 東京. 1999. p. 100.
- 9) 宮本比呂志, 谷口初美, 吉田真一: *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. 感染症誌 2003; 77(5): 343-5.
- 10) Horwitz MA: Characterization of avirulent mutant *Legionella pneumophila* that survive but do not multiply within human monocytes. J. Exp. Med. 1987; 166: 1310-28.
- 11) McKinney RM, Porschen RK, Edelstein PH, Bissett ML, Harris PP, Bondell SP, et al.: *Legionella longbeachae* species nova, another etiologic agent of human. Ann. Intern. Med. 1981; 94(6): 739-41.
- 12) Lim I, Sangster N, Reid DP, Lanser JA: *Legionella longbeachae* pneumonia: report of two cases. Med. J. Aust. 1989; 150(5): 599-601.
- 13) Ruehleemann SA, Crawford GR: Panic in the potting shed. The association between *Legionella longbeachae* serogroup 1 and potting soils in Australia. Med. J. Aust. 1996; 164(1): 36-8.
- 14) 山本景三, 野田康信, 権田秀雄, 大石尚史, 谷川吉政, 藪内英子: 救命し得た *Legionella longbeachae* による重症肺炎の 1 例. 感染症誌 2001; 75(3): 213-8.
- 15) Koide M, Higa F, Arakaki N, Saito A: Isolation of *Legionella longbeachae* and *Legionella* spp. from Japanese potting soils. In: Marre R, et al. ed. *Legionella*. ASM press, Washington, DC, 2002. p. 356-9.
- 16) Steele TW, Moore CV, Sangster N: Distribution of *Legionella longbeachae* serogroup 1 and other Legionellae in potting soils in Australia. Appl. Environ. Microbiol. 1990; 56(10): 2984-8.
- 17) 吉田真一: レジオネラ症. 歯界展望 1996; 88(3): 722-9.
- 18) 村上日奈子, 松本哲哉, 小林隆夫, 磯貝健次, 櫻谷総子, 古谷信彦, 他: わが国における *Legionella* 臨床分離株の薬剤感受性の検討. 感染症誌 2001; 75(1): 1-6.
- 19) 古畑勝則, 宮本比呂志, 原 元宣, 福山正文: 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—. 感染症誌 2003; 77(2): 83-8.

[連絡先: 〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71 麻布大学環境保健学部微生物学 古畑勝則]



【報文】

## LAMP 法による環境水からの *Legionella* 属菌の検出

安中 敏光<sup>1\*</sup>, 小島 禎<sup>1</sup>,  
池戸 正成<sup>1</sup>, 古畑 勝則<sup>2</sup>

### The Detection of Legionellae from Environmental Water Specimens by the LAMP Method

Toshimitsu ANNAKA<sup>1\*</sup>, Tadashi KOJIMA<sup>1</sup>,  
Masanari IKEDO<sup>1</sup> and Katsunori FURUHATA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Eiken Chemical Biochemical Laboratory,  
143 Nogi-machi Nogi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-0114, Japan  
<sup>2</sup>Azabu University, College of Environmental Health,  
1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan

The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method amplifies DNA with high specificity, sensitivity, and rapidity under isothermal conditions at 65°C. When used to examine *Legionella*, the LAMP method was able to detect a wide range of *Legionella* species with high specificity. The detection limit of the assay was 60 CFU per test of *L. pneumophila* strain. Furthermore, all of the positive LAMP results could be obtained within 50 minutes. Since this method has the ability to synthesize an extremely large amount of DNA, a large amount of by-product, pyrophosphate ion, a white precipitate of magnesium pyrophosphate is yielded in the reaction mixture. Accordingly, the LAMP reaction is able to be read as the turbidity of the reagent. This turbidity method has the same sensitivity and specificity as that of a method using a detection reagent as a fluorescent intercalating dye.

The LAMP method gave higher detection rates in 104 water samples than the conventional culture method did.

(Accepted 16 December 2003)

Key words : LAMP/*Legionella*/Detection (検出)/Water from the environment (環境水).

### 緒 言

レジオネラ症の多くは *Legionella* 属菌で汚染された水が何らかの理由によりエアロゾル化し、これを感受性宿主が経気道的に吸入することによって発症する例が多く、温泉水の誤嚥による肺炎の発症例も報告されている<sup>1-4)</sup>。臨床例において感染源が特定されることはまれであるが、クーリングタワー冷却水、温泉、循環式浴槽、噴水、プール、池、給水給湯設備、加湿器、呼吸管理装置な

どが感染源として知られている<sup>5)</sup>。こうした生活環境水中の *Legionella* 属菌の管理が重要視されているが、本菌の検査方法は培養法であり、結果を得るためには、最短でも1週間を要する<sup>2)</sup>。このような現状では、実際的な生活環境水の *Legionella* 属菌管理は困難で、迅速な検査法が求められている。

新しい遺伝子増幅法の Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法<sup>6)</sup> による *Legionella* 属菌の検出は、本属菌に対して特異

<sup>1</sup> 栄研化学(株)・生物化学研究所 〒329-0114 栃木県下都賀郡野木町野木143

<sup>2</sup> 麻布大学・環境保健学部 〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71

性に優れ、*L. pneumophila* では60 colony forming unit (CFU)/test まで検出可能と高い感度を有している<sup>6)</sup>。また増幅の有無を反応過程で生成されるピロリン酸塩とマグネシウムの沈殿物の濁度として計測が可能であることから<sup>7)</sup>、今回この濁度測定を用いた LAMP 法での *Legionella* 属菌の検出を保存菌株を用いて確認し、実際の生活環境水を用いて評価を行った。

## 実験方法

### 1. 試験菌株

*Legionella* 属菌は *L. pneumophila* の serogroup 11 種を含む12菌種31株を用い、

BCYE  $\alpha$  寒天培地 (栄研化学) で37°C、3日間培養した。*Legionella* 属以外の菌 (非 *Legionella* 属菌) はグラム陰性桿菌14菌種、グラム陽性球菌4菌種、各1株の計18菌種18株を用いた (Table 1)。これらの菌株のうち *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis* 以外の菌種は血液寒天培地 (栄研化学) を用い、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌は30°Cで18~48時間、それ以外の菌は37°Cで18時間培養した。*H. influenzae*, *B. catarrhalis* はチョコレート寒天培地 (栄研化学) で5% CO<sub>2</sub>条件下、37°Cで18時間培養した。試験に際しては、平板培地上の各菌株のコロニーを生理食塩水中に McFarland No.3.0 (約1.2×10<sup>9</sup>CFU/mL) になるように菌

Table 1. Histories and corresponding numbers of 31 legionellae strains and 18 other strains tested.

| No.      | Species  | Serogroup | Source                |
|----------|--|-----------|-----------------------|
| EKN 3677 | <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>      | 1         | ATCC* 33152           |
| EKN 3679 | <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>      | 2         | ATCC 33154            |
| EKN 3680 | <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>      | 3         | ATCC 33155            |
| EKN 3681 | <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>          | 4         | ATCC 33156            |
| EKN 3683 | <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>          | 5         | ATCC 33216            |
| EKN 3682 | <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>      | 6         | ATCC 33215            |
| F82-1211 | <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>      | 8         | Environmental isolate |
| F81-1210 | <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>      | 9         | Environmental isolate |
| F78-1163 | <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>      | 10        | Environmental isolate |
| F14-70G  | <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>      | 12        | Environmental isolate |
| F1-34G   | <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>      | 13        | Environmental isolate |
| EKN 5828 | <i>Legionella anisa</i>                                      |           | ATCC 35292            |
| EKN 3684 | <i>Legionella bozemanii</i>                                  |           | ATCC 33217            |
| EKN 3686 | <i>Legionella dumoffii</i>                                   |           | ATCC 33279            |
| EKN 5887 | <i>Legionella erythra</i>                                    |           | ATCC 35303            |
| EKN 6081 | <i>Legionella feeleyi</i>                                    |           | ATCC 35072            |
| EKN 3687 | <i>Legionella gormanii</i>                                   |           | ATCC 33297            |
| EKN 3689 | <i>Legionella longbeachae</i>                                |           | ATCC 33462            |
| EKN 3685 | <i>Legionella micdadei</i>                                   |           | ATCC 33218            |
| F85-342  | <i>Legionella oakridgensis</i>                               |           | Environmental isolate |
| F57-178  | <i>Legionella sainthelensi</i>                               |           | Environmental isolate |
| EKN 61   | <i>Achromobacter xylosoxidans</i> supsp. <i>xylosoxidans</i> |           | ATCC 27061            |
| EKN 62   | <i>Acinetobacter baumannii</i>                               |           | ATCC 19606            |
| EKN 2575 | <i>Acinetobacter lwoffii</i>                                 |           | ATCC 15309            |
| EKN 42   | <i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>           |           | ATCC 19209            |
| EKN 5652 | <i>Branhamella catarrhalis</i>                               |           | Clinical isolate      |
| EKN 358  | <i>Chryseobacterium indologenes</i>                          |           | ATCC 29897            |
| EKN 2590 | <i>Empedobacter breve</i>                                    |           | ATCC 43319            |
| EKN 4496 | <i>Escherichia coli</i>                                      |           | ATCC 11775            |
| EKN 2009 | <i>Haemophilus influenzae</i>                                |           | ATCC 9795             |
| EKN 5262 | <i>Klebsiella pneumoniae</i>                                 |           | ATCC 13883            |
| EKN 2588 | <i>Myroides odoratus</i>                                     |           | ATCC 4651             |
| EKN 6633 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                |           | ATCC 27853            |
| EKN 2553 | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                               |           | ATCC 13525            |
| EKN 2559 | <i>Pseudomonas stutzeri</i>                                  |           | ATCC 17588            |
| EKN 233  | <i>Serratia marcescens</i>                                   |           | ATCC 8100             |
| EKN 4542 | <i>Staphylococcus aureus</i>                                 |           | ATCC 25923            |
| EKN 5172 | <i>Staphylococcus epidermidis</i>                            |           | ATCC 14990            |
| EKN 4043 | <i>Streptococcus pneumoniae</i>                              |           | ATCC 49619            |
| EKN 6547 | <i>Streptococcus pyogenes</i>                                |           | ATCC 19615            |

\* ATCC; American Type Culture Collection

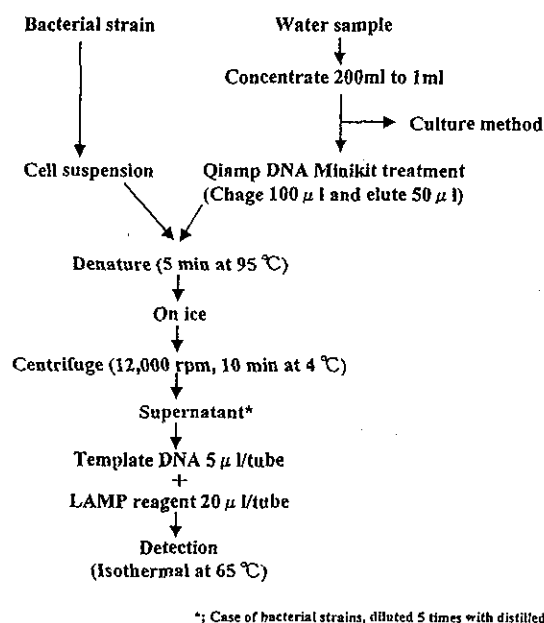


Fig.1. Protocol of the LAMP method and water sample treatment.

懸濁液を調製した。

## 2. LAMP 法

安中らの報告<sup>6)</sup>に従い、*Legionella* 属菌の16S rRNA 遺伝子とした LAMP プライマーを使用し、試験した。なお、今回のプライマーは *Legionella micdadei* も増幅可能に改良したものをを用いた。LAMP 反応は鎖置換型 DNA ポリメラーゼである *Bst* DNA polymerase (New England Biolabs, USA), プライマー, dNTPs (各1.4mM), 0.8M Betaine, バッファー (20mM Tris-KCl [pH8.8], 10mM KCl, 8mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Tween20) を含む反応溶液20 µl に、検体 5 µl を添加して65°Cの等温で90分間行った (Fig.1)。LAMP 増幅産物の検出には専用の濁度測定装置 LA-200 (テラメックス) を使用し、濁度を反応開始から経時的に測定し、反応時間内に明らかに濁度の上昇を示した検体を陽性と判定した。

## 3. 特異性試験

試験菌株は TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) を用いて、各菌懸濁液を *Legionella* 属菌は約  $6 \times 10^6$  CFU/ml, 非

*Legionella* 属菌は約  $6 \times 10^6$  CFU/ml および約  $6 \times 10^8$  CFU/ml に希釈した。これらは95°Cで5分間の熱処理後、氷冷して、12,000rpm, 4°C, 10分間の遠心分離を行い、その上清 1 µl を DNA 溶液として試験に用いた (Fig. 1)。すなわち、*Legionella* 属菌は約  $6 \times 10^3$  CFU/test 相当, 非 *Legionella* 属菌は約  $6 \times 10^3$  CFU/test 相当および約  $6 \times 10^5$  CFU/test 相当の DNA 溶液を検体として用いた。

## 4. 感度試験

*L. pneumophila* ATCC 33152 の菌懸濁液を TE 緩衝液を用いて約  $10^5$  CFU/test 相当になるよう調製し、これから6段階の10倍連続希釈系列を作製し、それぞれ95°Cで5分間の熱処理を行った。氷冷後、12,000rpm, 4°C, 10分間の遠心分離を行い、その上清 1 µl を検体として用いた。また無添加の陰性対照をあわせて試験した (Fig. 1)。菌懸濁液中の菌数は BCYE  $\alpha$  寒天培地を用いた生菌数測定法で確認した。

## 5. 生活環境水からの *Legionella* 属菌の検出

温泉浴用水78, 冷却塔水23, 給湯水2, 家庭浴用水1の計104検体を用いて、従来の培養法と LAMP 法を試験した。培養法は、レジオネラ症防止指針の検査法に従い試験した。200ml を 1ml に濃縮した検水の0.5ml を培養法に、残りの0.5ml を LAMP 法に用いた。培養法は酸処理後 WYO  $\alpha$  寒天培地 (栄研化学) を用いて *Legionella* 属菌の分離を行った。LAMP 法では濃縮した検水100 µl を、Qiamp DNA Minikit (QIAGEN 社) を用いて DNA を50 µl に抽出し、熱処理→氷冷→遠心分離した上清 5 µl を LAMP 法に用いた (Fig. 1)。

## 実験結果

### 1. LAMP 法の特異性

*Legionella* 属12菌種31株は、LAMP 法ですべて遺伝子の増幅が認められた。しかし、非 *Legionella* 属18菌種18株は、LAMP 法では約 6

Table 2. Specificity of LAMP for the detection of legionellae.

| Bacterial strain   | LAMP | Bacterial strain  | LAMP |
|--|------|---|------|
| <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> EKN 3677 | +    | <i>Achromobacter xylosoxidans</i> supsp. <i>xylosoxidans</i> EKN 61 | -    |
| <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> EKN 3679 | +    | <i>Acinetobacter baumannii</i> EKN 62                               | -    |
| <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> EKN 3680 | +    | <i>Acinetobacter lwoffii</i> EKN 2575                               | -    |
| <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> EKN 3681     | +    | <i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> EKN 42           | -    |
| <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> EKN 3683     | +    | <i>Branhamella catarrhalis</i> EKN 5652                             | -    |
| <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> EKN 3682 | +    | <i>Chryseobacterium indologenes</i> EKN 358                         | -    |
| <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F82-1211 | +    | <i>Empedobacter breve</i> EKN 2590                                  | -    |
| <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F81-1210 | +    | <i>Escherichia coli</i> EKN 4496                                    | -    |
| <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F78-1163 | +    | <i>Haemophilus influenzae</i> EKN 2009                              | -    |
| <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F14-70G  | +    | <i>Klebsiella pneumoniae</i> EKN 5262                               | -    |
| <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> F1-34G   | +    | <i>Myroides odoratus</i> EKN 2588                                   | -    |
| <i>Legionella anisa</i> EKN 5828                                 | +    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> EKN 6633                              | -    |
| <i>Legionella bozemanii</i> EKN 3684                             | +    | <i>Pseudomonas fluorescens</i> EKN 2553                             | -    |
| <i>Legionella dumoffii</i> EKN 3686                              | +    | <i>Pseudomonas stutzeri</i> EKN 259                                 | -    |
| <i>Legionella erythra</i> EKN 5887                               | +    | <i>Serratia marcescens</i> EKN 233                                  | -    |
| <i>Legionella feeleii</i> EKN 6081                               | +    | <i>Staphylococcus aureus</i> EKN 4542                               | -    |
| <i>Legionella gormanii</i> EKN 3687                              | +    | <i>Staphylococcus epidermidis</i> EKN 5172                          | -    |
| <i>Legionella longbeachae</i> EKN 3689                           | +    | <i>Streptococcus pneumoniae</i> EKN 4043                            | -    |
| <i>Legionella micdadei</i> EKN 3685                              | +    | <i>Streptococcus pyogenes</i> EKN 6547                              | -    |
| <i>Legionella oakridgensis</i> F85-342                           | +    |   |      |
| <i>Legionella sainthelensi</i> F57-178                           | +    |   |      |

$\times 10^3$  CFU/test 相当および約  $6 \times 10^5$  CFU/test 相当のいずれの場合でもすべて遺伝子の増幅が認められなかった (Table 2)。

## 2. LAMP 法の検出感度

試験に用いた試料中の菌数は、6 CFU/test から  $6 \times 10^5$  CFU/test の6段階であった。

LAMP 法による *L. pneumophila* ATCC

33152の検出は6 CFU/test まで可能であり、検出時間に要する時間は50分以内であった (Fig.2)。

## 3. 生活環境水からの *Legionella* 属菌の検出

温泉浴用水78, 冷却塔水23, 給湯水2, 家庭浴用水1の計104検体を用いて、従来の培養法とLAMP法を試験した結果、培養法で *Legionella*

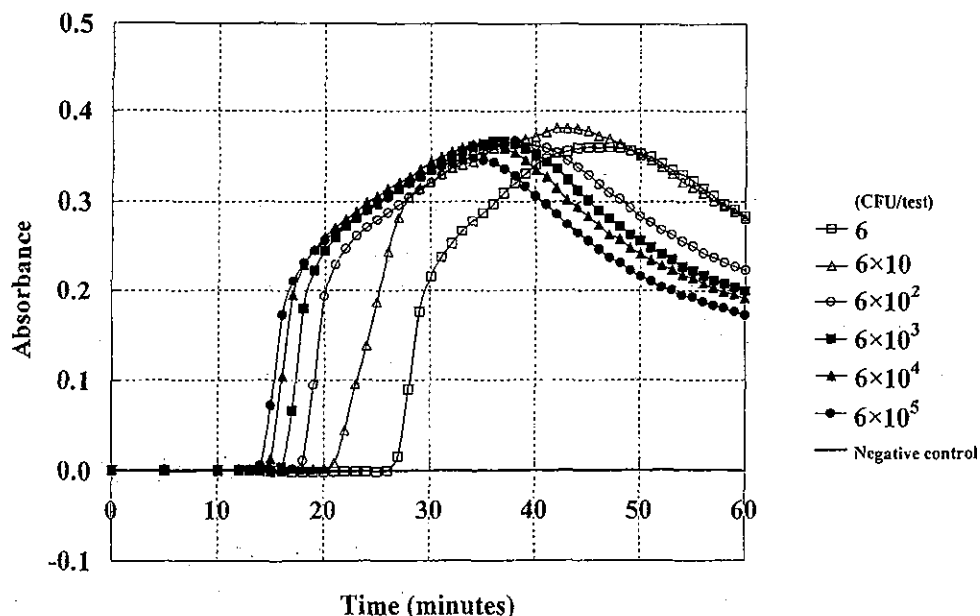


Fig.2. Sensitivity of LAMP for *Legionella pneumophila* ATCC 33152. Bacterial cell number per assay was 6 (□),  $6 \times 10^1$  (△),  $6 \times 10^2$  (○),  $6 \times 10^3$  (■),  $6 \times 10^4$  (▲), and  $6 \times 10^5$  CFU (●).