

図2 PCR-DGGE 法による試料中の細菌叢解析

a: 蛇口水、b: 風呂バイオフィルム個人宅1、c: 風呂バイオフィルム個人宅2

レーンとバンドを併記した番号は以降の塩基配列の解析と対応している

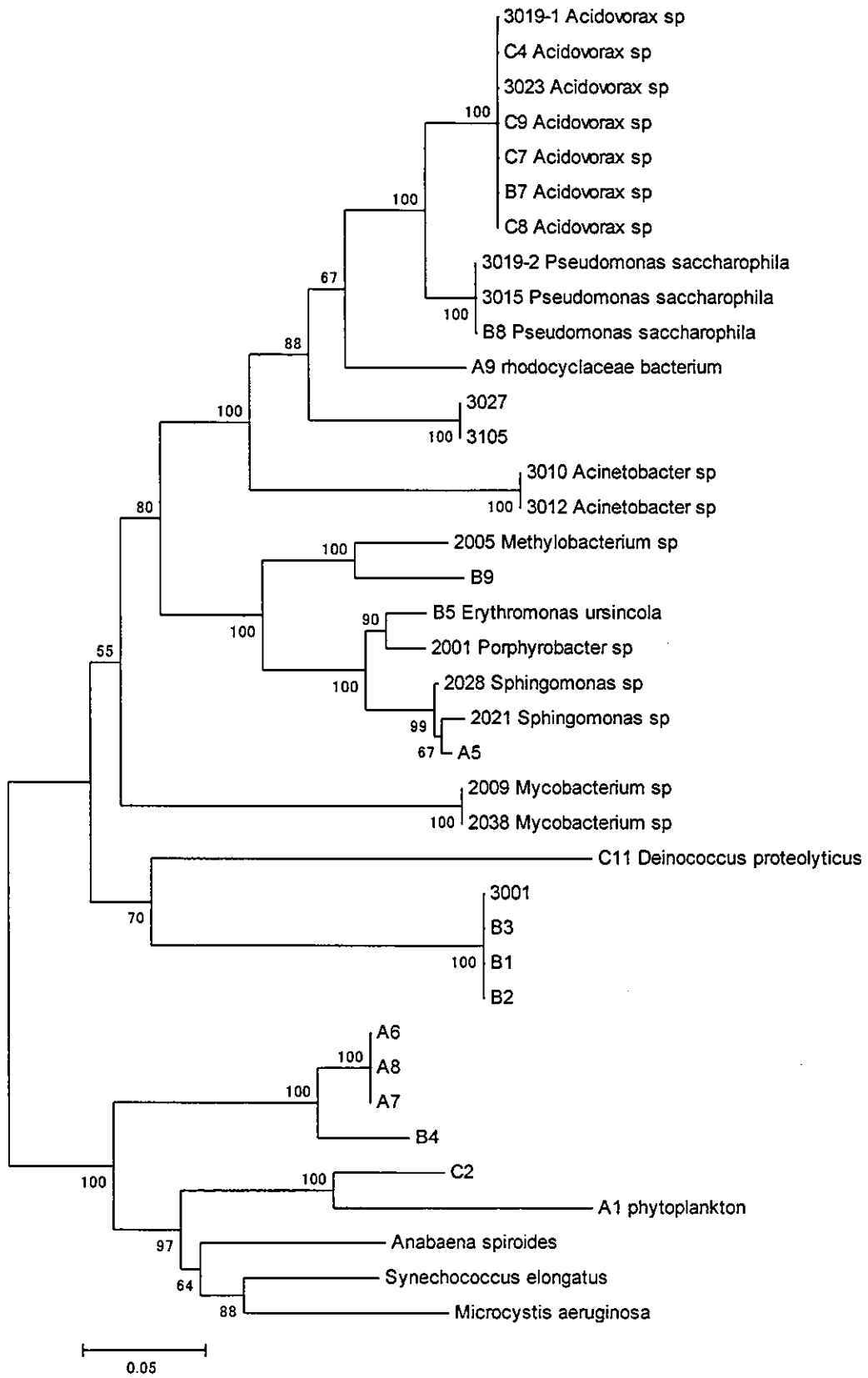


図4 本研究で得た配列より構築した系統樹

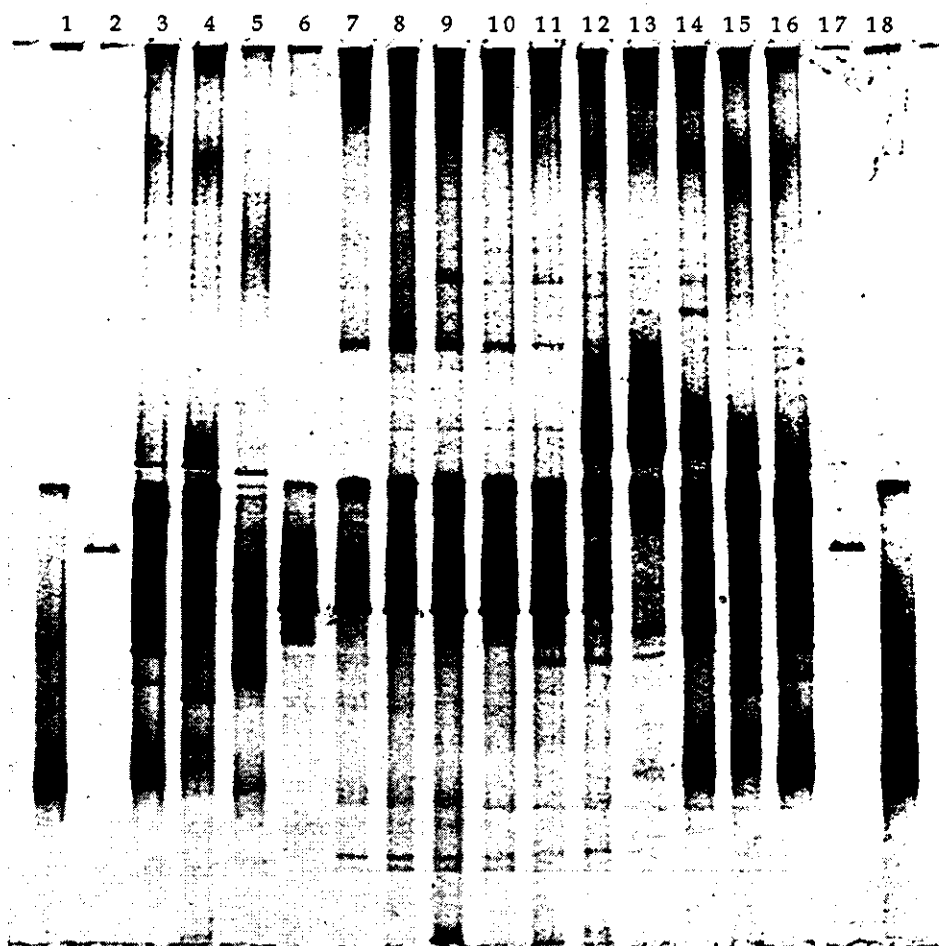


図5 水道水を42℃に加温したモデル浴槽水試料からのDGGE像

レーン1: *Bacillus subtilis*, 2: *Legionella pneumophila*, 3: マーカーA, 4: マーカーBD、
 5: 実験0日目、6: 1日目、7: 3日目、8: 5日目、9: 7日目、10: 10日目、11: 14日
 目、12: 21日目、13: 30日目、14: 42日目、15: マーカーBD、16: マーカーA、17:
Legionella pneumophila, 18: *Bacillus subtilis*

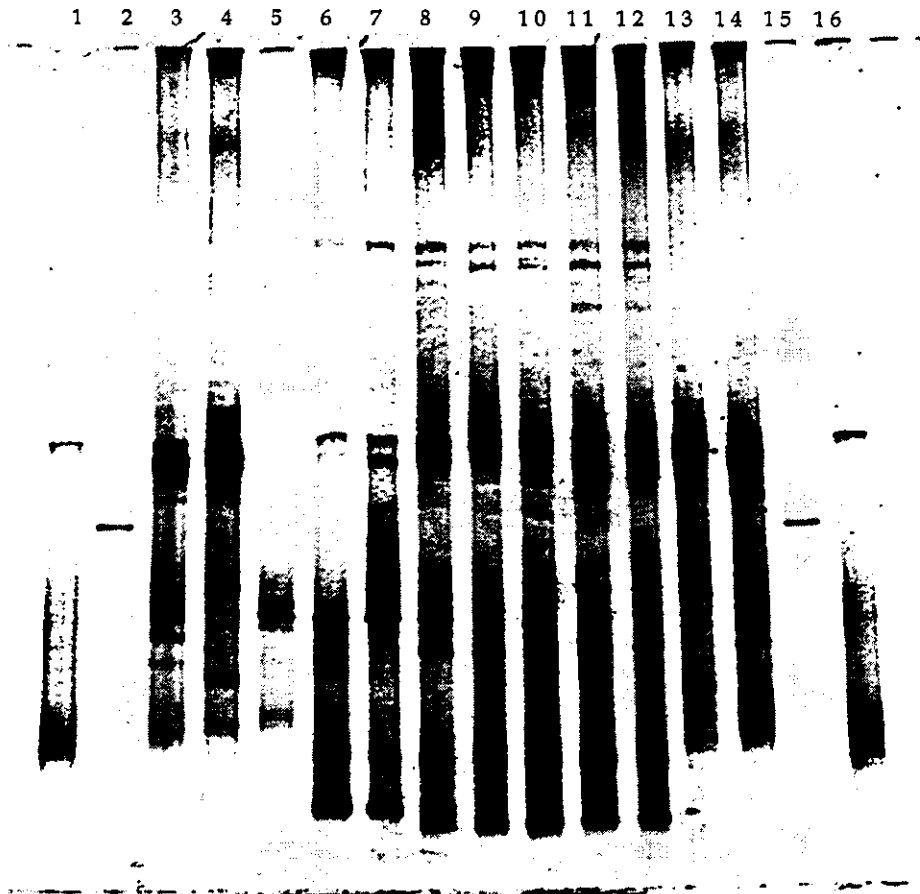


図6 グルコース添加水道水を42℃に加温したモデル浴槽水試料からのDGGE像
 レーン1: *Bacillus subtilis*, 2: *Legionella pneumophila*, 3: マーカーA, 4: マーカーBD、
 5: 実験1日目、6: 3日目、7: 5日目、8: 7日目、9: 10日目、10: 14日目、11: 21日
 目、12: 30日目、13: マーカーBD、14: マーカーA、15: *Legionella pneumophila*, 16:
Bacillus subtilis

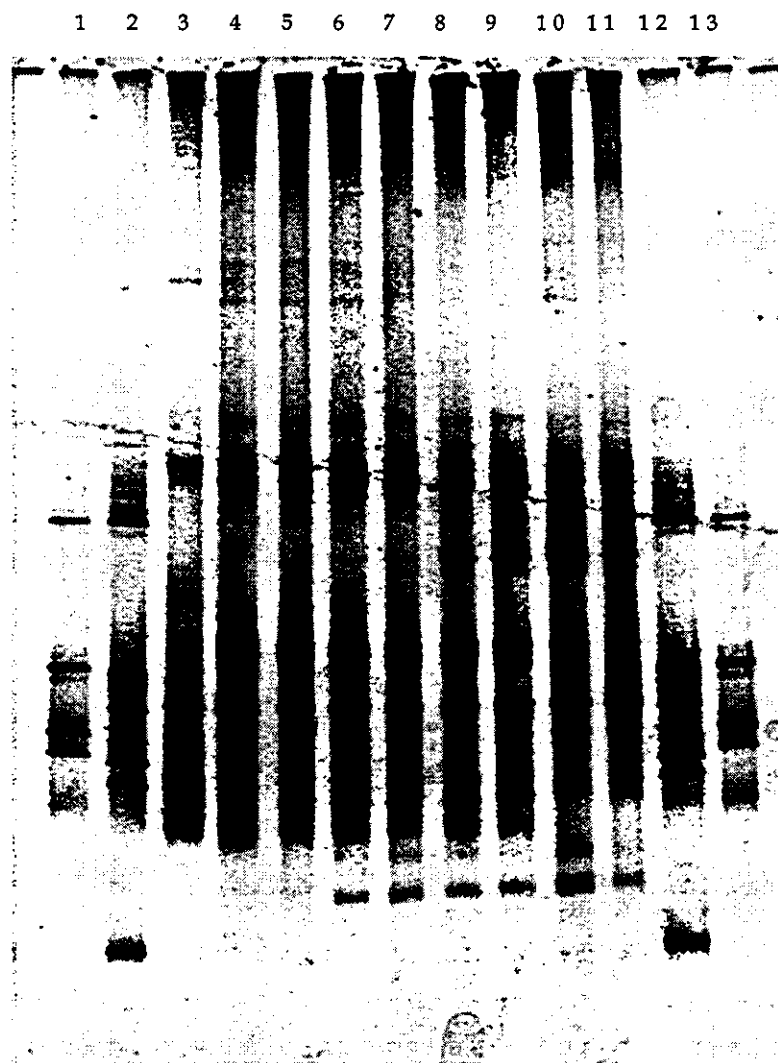


図7 温泉水を42℃に加熱したモデル浴槽水試料からの DGGE 像

レーン1: マーカーA、2: マーカーBD、3: 実験0日目、4: 1日目、5: 3日目、6: 5
 日目、7: 7日目、8: 10日目、9: 14日目、10: 21日目、11: 30日目、12: マーカーBD、
 13: マーカーA

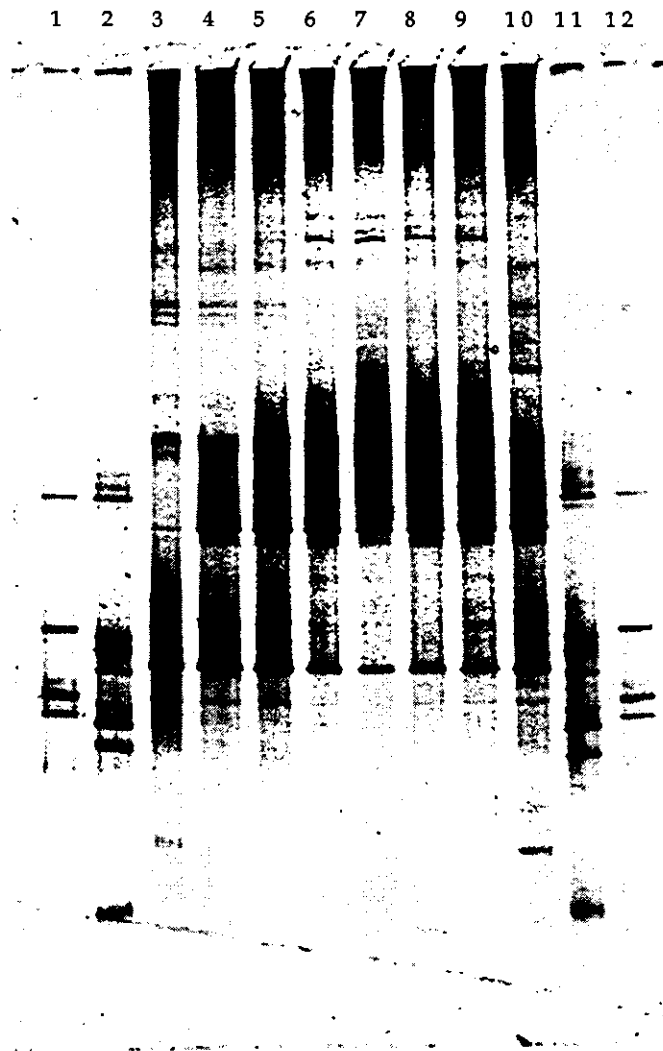


図8 グルコース添加温泉水を42℃に加温したモデル浴槽水試料からの DGGE 像
レーン1: マーカーA、2: マーカーBD、3: 実験1日目、4: 3日目、5: 5日目、6: 7
日目、7: 10日目、8: 14日目、9: 21日目、10: 30日目、11: マーカーBD、12: マー
カーA

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究

浴槽水におけるレジオネラ属菌の検出状況、
特に *Legionella pneumophila* 血清群 1 の推移について

分担研究者：倉 文明（国立感染症研究所細菌第一部）
研究協力者：前川純子、常 彬（国立感染症研究所細菌第一部）
鈴木敦子、市瀬正之（東京都予防医学協会検査研究センター）

（研究要旨）近年いくつかのレジオネラ症の集団感染事例を通じて、循環式浴槽の塩素消毒が進み、相対的にレジオネラ属菌の検出率は低下してきている。一方、その集団感染事例の起因为菌となってきた *Legionella pneumophila* 血清群 1 の年度別の推移はこれまで明らかでなかった。そこで、平成 13～14 年度の浴槽水のレジオネラ属菌株の種類を、市販の免疫血清で同定されていなかったレジオネラ属菌株を含め詳細に同定した。その結果、不明株として保存されていた浴槽水由来株の 94% は *Legionella pneumophila* で、群別不能株と血清群 7 が多かった。平成 8 年～12 年度に比べ、平成 13 年度は *Legionella pneumophila* 血清群 1 分離株の割合が増え、検体当りの *Legionella pneumophila* 血清群 1 の陽性率も増加した。

A. 研究目的

近年いくつかのレジオネラ症の集団感染事例を通じて、循環式浴槽の塩素消毒が進み、相対的にレジオネラ属菌の検出率は低下してきている。浴槽水のレジオネラ陽性率は平成 8 年の 85% から平成 12 年の 47% まで漸減してきた（鈴木敦子ら、感染症学雑誌 76 巻、703 頁、平成 14 年）。一方、平成 12 年静岡県、茨城県及び 14 年宮崎県（論文発表 3 参照）、鹿児島県の循環式浴槽における集団感染事例の起因为菌となってきた *Legionella pneumophila* 血清群 1 の年度別の推移はこれまで明らかでなかった。そこで、平成 13～14 年度の浴槽水のレジオネラ属菌株の種類を、市販の免疫血清で同定されていなかったレジオネラ属菌株を含め詳細に同定し、*Legionella pneumophila* 血清群 1 の推移を考察した。

B. 研究方法

検体採取、搬入、保存、検査方法は、鈴木敦子ら（感染症学雑誌 76 巻 703 頁、平

成14年)によった。平成13年度及び14年度に東京都予防医学協会に凍結保存され、デンカ生研の10種のレジオネラ免疫血清で同定できなかった、日本全国から集められた検体由来のレジオネラ属菌環境分離株81株を同定した。これらの81株の内訳は、浴槽水由来48株、冷却塔水由来31株、その他2株(工業用水、及び貯湯槽水由来)だった。鈴木敦子らにより、平成13年度は1648検体の浴槽水の内、472検体からレジオネラ属菌が検出され(陽性率28.6%)、対照とした冷却塔水427検体内、196検体(45.9%から)からレジオネラ属菌が検出されている。

分離されたレジオネラ属菌コロニーの同定は、1) Oxoid社のレジオネラ・ラテックステスト(*Legionella pneumophila* 血清群1、*Legionella pneumophila* 血清群2-14、レジオネラ属の3種のラテックス) 2)デンカ生研のレジオネラ免疫血清(*Legionella pneumophila* 血清群1から15の15種類、*L. micdadei*、*L. bozemanii* 血清群1、*L. dumoffii*、*L. gormanii*、以上19種類)によるスライド凝集反応、という血清学的同定、3) 極東製薬工業のDDHレジオネラ極東(DNA-DNAハイブリダイゼーション用キット)、4)レジオネラ属特異的な5SrRNAプライマーと、*Legionella pneumophila* 特異的なmipプライマーによるPCR(国立感染症研究所業務課:レジオネラ症検査マニュアル2003)、5)16SrRNAの遺伝子の部分配列決定(論文発表3参照)等の遺伝学的な同定、3)長波紫外線365nmによる自発蛍光の観察、によった。まず自発蛍光の有無を確認し、ラテックス凝集反応により菌株を大別した。さらに、デンカ生研の特異免疫血清で凝集しない株あるいは、複数に凝集した株は、PCRにより*Legionella pneumophila*かどうかを鑑別し、DNA-DNAハイブリダイゼーションで確認した。

(倫理面への配慮) 実験動物やヒトへの検査は含まれていない。また、環境株の分離施設は特定されないようにデータを整理してあるので、倫理面の配慮はなされている。

C. 研究結果

平成13年-14年度に不明株として保存されていた浴槽水由来株48株の94%は*Legionella pneumophila*で、群別不能株(UT)と血清群7が多かった。*Legionella pneumophila*を他のレジオネラ属菌と鑑別するためのPCRで得られた種の同定結果と、DNA-DNAハイブリダイゼーションで得られた種の同定結果は一致した。検査した81株のうち、2株のみが長波紫外線の下、青白色の自発蛍光を発し、これらはその他の*Legionella spp.*であった(表1, 図1)。

平成13年度の保存株に限ると、浴槽水のレジオネラ属菌は、*Legionella pneumophila* 血清群1、3、4、5、6、UTが11.6%-24.1%と各血清群に広く分布していた(表2, 図2)。一方、冷却塔水では、*Legionella pneumophila* 血清群1が58.3%と多く、血清群7が19.1%、血清群4が17.4%と多かった。

D. 考察

これまで、浴槽水由来のレジオネラ属菌は、*L. pneumophila* 血清群3-6が多く、一方、冷却塔水由来のレジオネラ属菌は、*L. pneumophila* 血清群1が多いと報告されてきた(図3, 図4)。しかし、分離株に占める *L. pneumophila* 血清群1の%は、平成8-11年度に比べ、平成13年では、浴槽水、冷却塔水ともそれぞれ、5.7%→18.8%、32.4%→48.7%と特に浴槽水で急増した。

検体当りのレジオネラ属菌陽性率は、平成8-11年度に比べ、平成13年度で冷却塔水で46.0%から45.9%と変わらないが(表4)、浴槽水では48.0%から28.6%に低下している(表3)。一方、検体当りの *L. pneumophila* 血清群1の陽性率は、平成8-11年度に比べ、平成13年度では、浴槽水、冷却塔水ともそれぞれ2.7%→5.4%、14.9%→22.3%と増加した(表3、表4、図5、図6)。

浴槽水ではないが、海外で給湯水のレジオネラ属菌の汚染状況の調査(Borella P等、Emerging infectious Diseases 10:p457, 2004)において、遊離塩素濃度の高い給湯水で *L. pneumophila* 血清群1が他の血清群の *L. pneumophila* より多く検出されていることから、近年の塩素消毒が多用されてきた浴槽水で *L. pneumophila* 血清群1の増加が懸念される。日本の循環式浴槽でおきた大規模な集団感染事例がいずれも *L. pneumophila* 血清群1を起因菌としたことから注意が必要である。今後は、検体あたりの *L. pneumophila* 血清群1陽性率だけでなく、検体あたりの *L. pneumophila* 血清群1の濃度の推移を含めて明らかにしたい。

E. 結論

平成13年度-14年度に不明株として保存されていた浴槽水由来株の94%は *Legionella pneumophila* で、*Legionella pneumophila* 群別不能株と血清群7が多かった。平成8年-12年度に比べ、平成13年度は浴槽水分離株の内、大規模集団感染事例の起因菌である *Legionella pneumophila* 血清群1の割合が増え、検体当りの *Legionella pneumophila* 血清群1の陽性率も増加していた。

F. 健康危惧情報

確定的な情報はなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Amemura-Maekawa J, Hayakawa Y, Sugie H, Moribayashi A, Kura F, Chang B, Wada A, Watanabe H: Legioliulin, a new isocoumarin compound responsible for blue-white autofluorescence in *Legionella (Fluoribacter) dumoffii* under long-wave length UV light, Biochem Biophys Res Commun 323 (3):954-959, 2004.
- 2) Chang B, Amemura-Maekawa J, Kura F, Kawamura I, Watanabe H: Expression

of IL-6 and TNF- α in human alveolar epithelial cells is induced by invading, but not by adhering, *Legionella pneumophila*. Microb Pathog 37: 295-302, 2004.

- 3) 東 美香、河野喜美子、倉 文明、前川純子、渡辺治雄、八木田健司、遠藤卓郎、鈴木 泉：循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 I. 発症状況と環境調査、感染症学雑誌印刷中。

2. 学会発表

- 1) 前川純子、倉 文明、常 彬、渡辺治雄： *Legionella dumoffii* の産生する新規蛍光物質の同定、第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月、大阪。
- 2) 常 彬、倉 文明、前川 純子、渡辺 治雄：レジオネラ感染のヒト肺胞上皮 II 型細胞に対するサイトカインの発現・分泌への誘導作用、第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月、大阪。
- 3) 小林静史、倉 文明、前川純子、高橋朋子、渡辺治雄： *Legionella pneumophila* 感染における Lgn1 遺伝子の機能についてコンジェニックマウスを用いた解析、第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月、大阪。
- 4) 倉 文明、前川純子、八木田健司、遠藤卓郎、池野まり子、辻 英高、田口真澄、小林一寛、渡辺治雄：客船に関連したレジオネラ症の集団発生における感染源の分子疫学、第 78 回日本感染症学会総会、2004 年 4 月、東京。

3. 総説

- 1) 倉 文明：今ふえているレジオネラ症-その正体と予防対策、食と健康、48 (7) : 54-63, 2004.
- 2) 倉 文明、前川純子、渡辺治雄：レジオネラ症、感染症の事典（国立感染症研究所学友会編）、265-266, 朝倉書店、東京、2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特願 2004-201503 提出日平成 16 年 7 月 8 日

発明者：倉 文明、前川純子、渡邊治雄、小林静史、高橋朋子

発明の名称：マクロファージのレジオネラ・ニューモフィラ感受性を支配する遺伝子の導入マウス

2. 実用新案登録 なし。

3. その他 なし。

表1

平成13年～14年	浴槽水	冷却塔水	その他	合計株数
<i>L. pneumophila</i> SG7	12	23	1	36
SG8	1	1	0	2
SG9	2	3	0	5
SG10	0	1	0	1
SG11	1	0	1	2
SG12	1	1	0	2
SG13	0	0	0	0
SG14	0	0	0	0
SG15	1	0	0	1
<i>L. pneumophila</i> UT	27	0	0	27
<i>L. jordanis</i>	0	1	0	1
<i>L. oakridgensis</i>	0	1	0	1
その他の <i>Legionella</i> spp.	3	0	0	3
合計	48	31	2	81

表 2

平成 13 年度保存株	浴槽水	冷却塔水	その他	合計
<i>L. pneumophila</i> SG1	16	67	0	83
SG2	2	0	0	2
SG3	14	1	0	15
SG4	27	20	0	47
SG5	20	2	0	22
SG6	18	3	0	21
SG7	0	22	1	23
SG8	0	0	0	0
SG9	0	0	0	0
SG10	0	0	0	0
SG11	0	0	1	1
SG12	0	0	0	0
SG13	0	0	0	0
SG14	0	0	0	0
SG15	0	0	0	0
<i>L. pneumophila</i> UT	13	0	0	13
<i>L. micdadei</i>	1	0	0	1
<i>L. dumoffii</i>	1	0	0	1
合計	112	115	2	229

表 3

浴槽水	期 間	<i>L. pneumophila</i>						L.	L.	L.	L.	<i>Legionella</i> spp.	合計
		SG1	SG2	SG3	SG4	SG5	SG6	<i>micdadei</i>	<i>dumoffii</i>	<i>bozemanii</i>	<i>gormanii</i>		
株 数	1996.04 - 2000.11	30	8	116	46	178	86	0	1	0	0	62	527
	2001 年度	108	8	70	64	138	75	8	2	1	1	101	576
全株に対 する陽性 率 (%)	1996.04 - 2000.11	5.7	1.5	22.0	8.7	33.8	16.3	0.0	0.2	0.0	0.0	11.8	100.0
	2001 年度	18.8	1.4	12.2	11.1	24.0	13.0	1.4	0.3	0.2	0.2	17.5	100.0
検体当り の陽性率 (%)	1996.04 - 2000.11	2.7	0.7	10.6	4.2	16.2	7.8	0.0	0.1	0.0	0.0	5.6	48.0
	2001 年度	5.4	0.4	3.5	3.2	6.9	3.7	0.4	0.1	0.0	0.0	5.0	28.6

表 4

冷却塔水	期 間	<i>L. pneumophila</i>						L.	L.	L.	L.	<i>Legionella</i> spp.	合計
		SG1	SG2	SG3	SG4	SG5	SG6	<i>micdadei</i>	<i>dumoffii</i>	<i>bozemanii</i>	<i>gormanii</i>		
株 数	1996.04 - 2000.11	138	1	11	50	7	6	4	1	3	0	205	426
	2001 年度	110	0	1	49	4	5	0	0	1	0	56	226
全株に対 する%	1996.04 - 2000.11	32.4	0.2	2.6	11.7	1.6	1.4	0.9	0.2	0.7	0.0	48.1	100.0
	2001 年度	48.7	0.0	0.4	21.7	1.8	2.2	0.0	0.0	0.4	0.0	24.8	100.0
検体当り の陽性率 (%)	1996.04 - 2000.11	14.9	0.1	1.2	5.4	0.8	0.6	0.4	0.1	0.3	0.0	22.1	46.0
	2001 年度	22.3	0.0	0.2	10.0	0.8	1.0	0.0	0.0	0.2	0.0	11.4	45.9

図 3

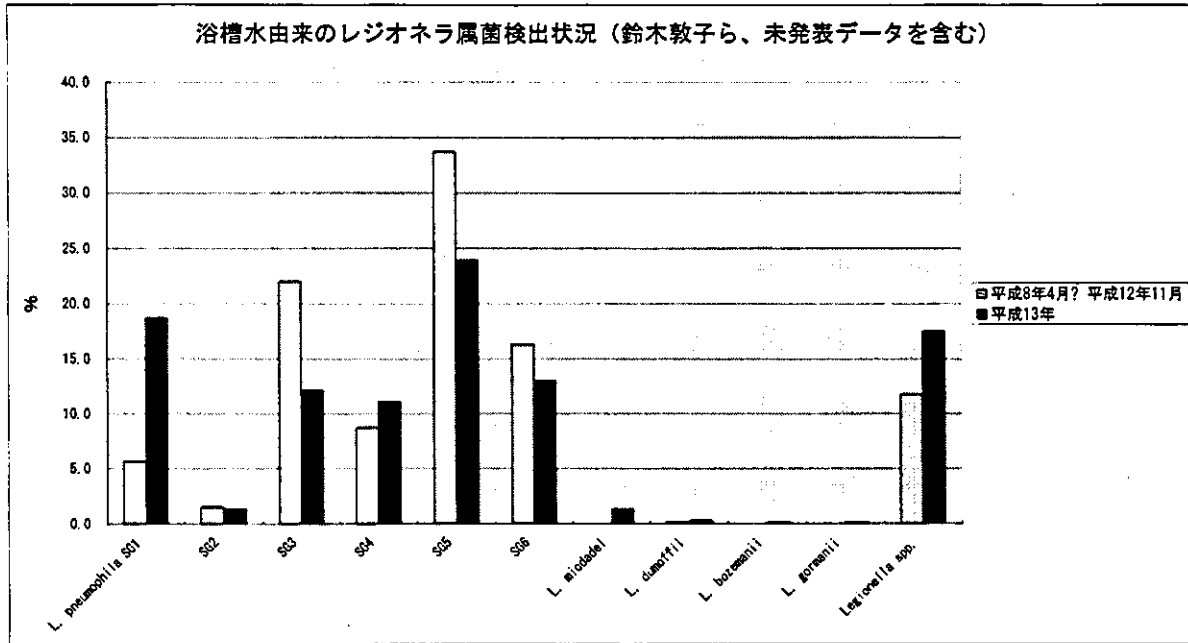


図 4

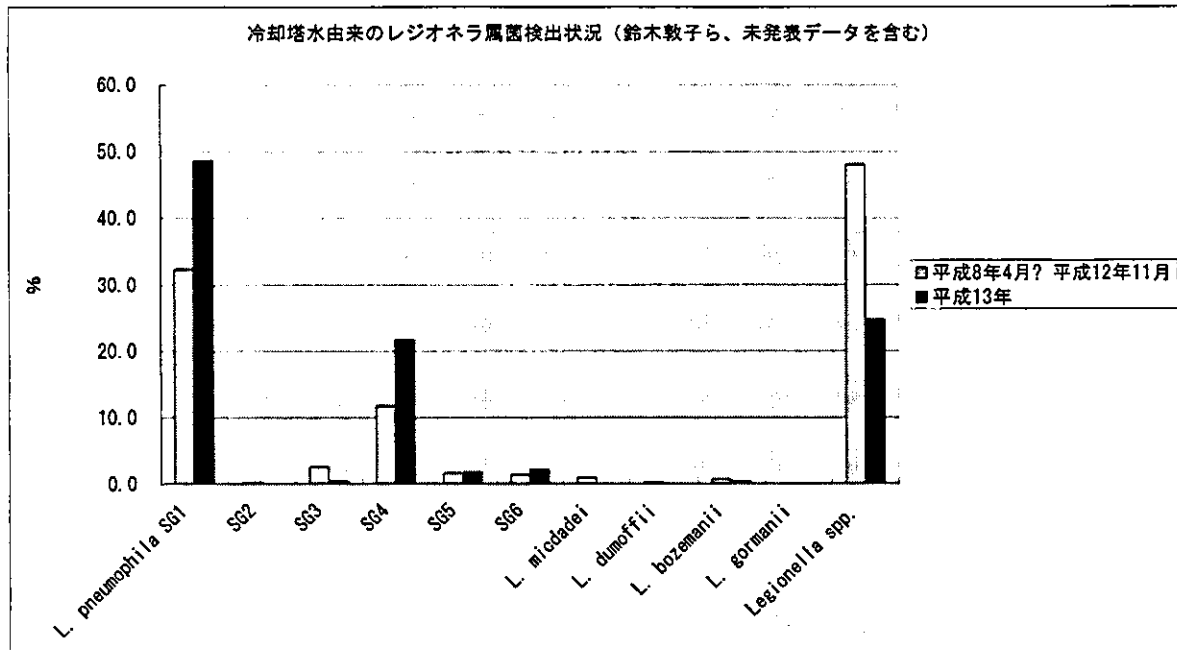


図5

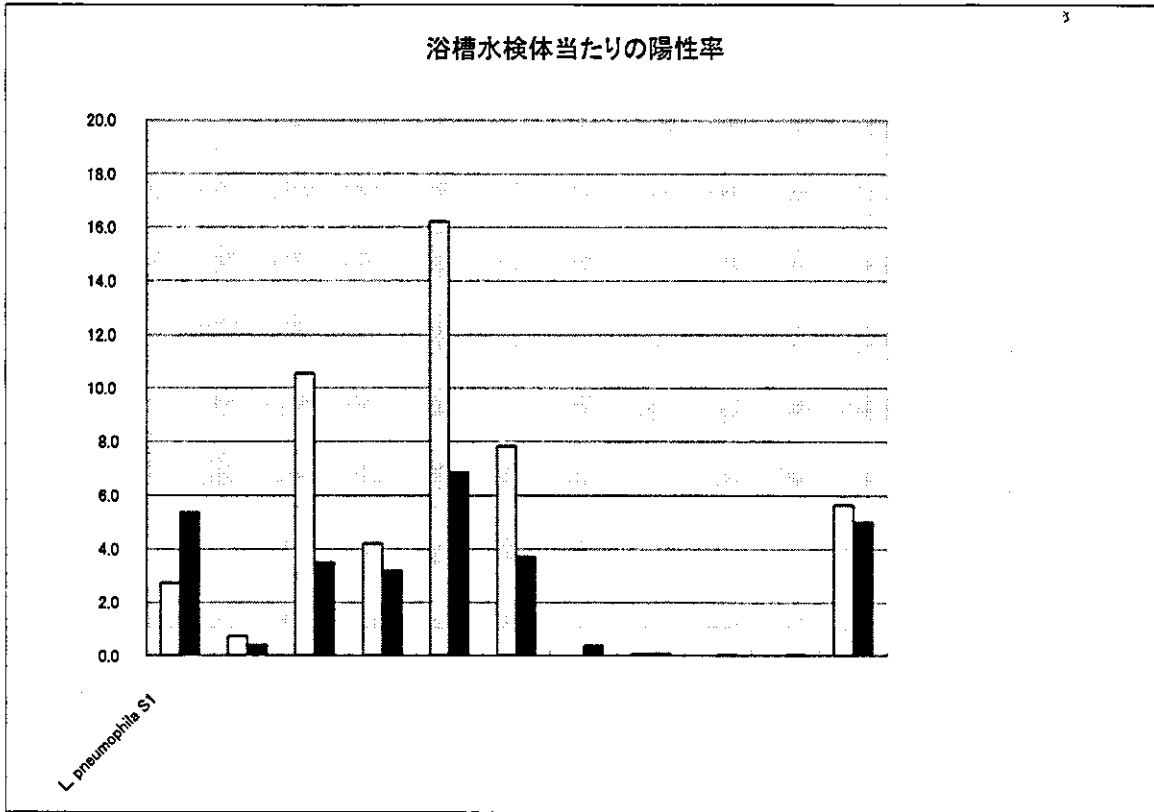
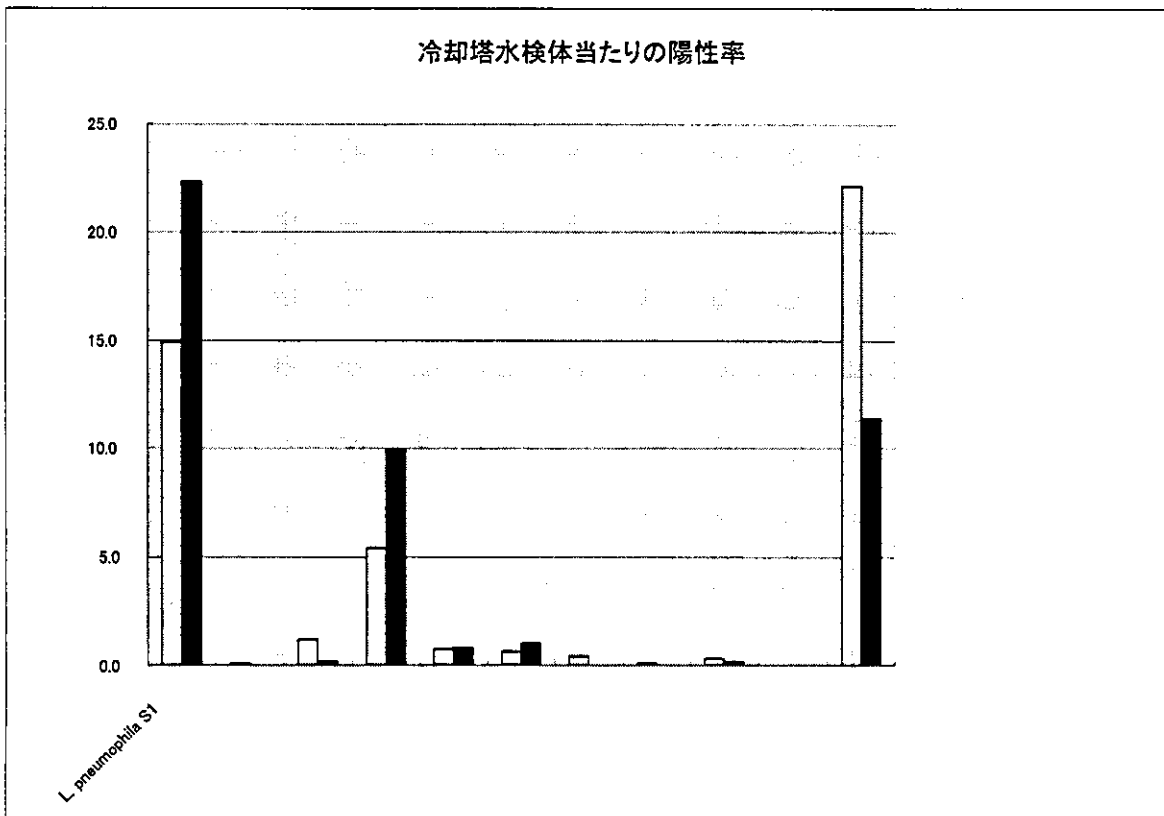


図6



循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究

レジオネラ属菌の宿主アメーバ内増殖—細胞内菌数の定量的測定—

主任研究者:	遠藤 卓郎	国立感染症研究所
分担研究者:	八木田健司	国立感染症研究所
	泉山 信司	国立感染症研究所
	縣 邦雄	アクアス つくば総合研究所
研究協力者:	藪崎 裕昭	アクアス つくば総合研究所

概要

宿主アメーバ内増殖がレジオネラ属菌の感染性に及ぼす影響を明らかにするために、基礎的検討として宿主アメーバ細胞内で増殖しうる菌数を定量した。宿主アメーバ *Acanthamoeba castellanii* およびレジオネラ属菌 *L. pneumophila* /SG1 の共培養系で、感染後、菌が活発に細胞内運動するアメーバをマイクロマニピュレーション法で単離し、その細胞内菌数を BCYE α 培地を用いて定量した。径 15-25 μ m の大きさのアメーバの場合、1 細胞あたりの培養可能な菌数はおおよそ 1000 個と算定された。感染したアメーバ内から培養される菌数は、個々のアメーバ細胞によって差が見られたが、培養条件である培地 pH、培養温度また培地成分のピロリン酸鉄濃度による影響は認められなかった。また菌の増殖性に関して、培地のメーカーにより著しく低下する場合があります、アメーバ内増殖菌の培養に際しては注意を要するものと思われた。

A: 目的:

本研究は、アメーバ細胞内増殖したレジオネラ属菌には感染性の向上、形態、また生化学的特性の変化など、*in vitro* 培養系で増殖した場合とは異なる点が多いことから、アメーバ内増殖というプロセスがヒトへの感染にどのように影響を及ぼすか、動物実験から明らかにすることを目的としている。アメーバ感染後のレジオネラの細胞内発育は、アメーバの細胞ごとにその速度が異なることから、発育段階という条件を変えながら定量的に菌の感染性を比較するためには、まず同一発育段階の菌を得ることが必要であり、さらに、感染条件として菌数を同一にする必要性が生ずる。そこで本年度は、定量的な感染実験の条件を設定するために、レジオネラ感染アメーバを単離し細胞内の菌を回収する方法を確立し、さらに単離したアメーバ内で増殖したレジオネラの菌数を培養法により定量した。

B: 研究方法

材料および方法：

1) アメーバの調整

本研究ではレジオネラ属菌の感染用宿主アメーバとして *Acanthamoeba castellanii* (JAC/E1 株、臨床分離株) を用いた。アメーバは無菌培養用 PYGC 培地を用い、25cm² フラスコ内で 30℃にて培養した。アメーバは高密度に増殖するとシスト化し、シスト状態ではレジオネラ感染が不能となるため、比較的低密度（およそ 10⁶アメーバ/フラスコ）ですべてのアメーバが栄養体で増殖している状態で感染実験に使用した。

2) レジオネラ属菌の調整

感染用レジオネラ属菌には、*L. pneumophila*/SG1 (冷却塔水分離株) を用いた。実験には常に -80℃凍結保存していたものを BCYE α にて 3~4 日間、35℃にて培養したものを用いた。BCYE α 培地は Legionella Agar Base (DIFCO, #218301) にサプリメントとしてピロリン酸鉄および L-システイン 1 塩酸塩をそれぞれ標準濃度に加えたものを要時調整して用いた。また、必要に応じて Legionella CYE Agar Base (OXOID, #CM0655) にサプリメントとして Legionella BCYE Growth Supplement (OXOID, SR 0110A)を加えた OXIDO 製培地、あるいは国内の栄研化学社製レジオネラ用生培地（市販プレート）「」を用いた。

3) レジオネラ属菌のアメーバ感染

BCYE α 培養のレジオネラ属菌のコロニーを回収し、菌濃度がおよそ 0.1OD となるように滅菌蒸留水中に浮遊させた。宿主アメーバのフラスコより培地をすべて除去した後、4.5ml の新鮮な PYGC 培地および 0.5ml の上記レジオネラ浮遊液を加え、フラスコ内で十分混和した。培養は 30℃で行い、経時的に位相差顕微鏡を用いて宿主アメーバの形態変化、アメーバ内における菌の活性化を観察した。

4) レジオネラ感染アメーバの単離

PYGC 培地中で感染後、菌の細胞内増殖を確認した感染アメーバをフラスコ内で穏やかに浮遊させ、15ml 容量の遠心管にその浮遊液を移した。500rpm、3 分間の遠心でアメーバ外に遊離していた菌を上清に分離し、沈渣としてアメーバを回収した。沈渣には 0.5ml の PYGC を加え穏やかにアメーバを再浮遊させた。60mm 径のプラスチックシャーレに 5ml の PBS (-) あるいは PYGC 入れ、そこに穏やかにアメーバ再浮遊液 50 μ l を加え、軽く混和してシャーレ内全体にアメーバを分散させた。数分後、シャーレ底面に静置したアメーバを位相差顕微鏡下でマイクロマニピュレーション法により吸引回収した。具体的には微細ガラスマイクロピペットを先端に取り付けたゴム製チューブを用いて吸引するという方法である。本実験では細胞内で菌が活性化し激しく運動している、ほぼ大きさの同一な（径およそ 20 μ m）アメーバを単離用に選択した。ピペット先端内に回収したアメーバは別のシャーレに用意した PBS (-) あるいは PYGC 中に加圧放出し単離を確認するとともに、吸引放出を数回繰り返