

*M. tuberculosis* による新規登録の全結核患者数は、平成 16 年度には 29,736 人で罹患率（人口 10 万対）は 23.3 であり、結核死亡者数は 2,328 人で死亡率（人口 10 万対）は 1.8 で死亡原因の 25 位であった。今回の浴槽水調査では昨年同様に、結核菌(*M. tuberculosis*)は、検出されなかったため浴槽水から結核菌に感染する可能性はほとんどないと考えられた。

非結核性抗酸菌症の毎年の新規発生状況は不明であるが、非定型抗酸菌症研究協議会が 2001 年 4 月から 9 月までの間に新規に診断した 521 施設からのアンケート調査結果によれば、全抗酸菌症中 29% の比率で NTM 症が発生していた。その内訳は、*M. avium* 症例が 57.8%、*M. intracellulare* 症が 25.0%、*M. kansasii* 症が 8.1% とこの 3 菌種で 91% を占め、残りの 9% が *M. gordonae*、*M. abscessus*、*M. fortuitum*、*M. chelonae*、*M. szulgai*、*M. scrofulaceum*、*M. xenopi* などであった。今回の調査では、*M. gordonae* 2 株、*M. avium* 11 株、*M. fortuitum* 1 株が分離されている。過去に、家庭用の 24 時間風呂の浴槽水から感染したと考えられる *M. avium* による皮膚感染症例が報告され、家庭用の 24 時間風呂の浴槽水には、レジオネラ菌と共に非結核性抗酸菌の存在が先人の調査で明らかとなったので、これらの菌が、NTM 症を引き起こす可能性は否定できない。しかし、非結核性抗酸菌は、日和見感染菌であるため菌が分離されたからといって即病気を起こす原因にはならないが、浴槽内や配管の清掃や消毒により、抗酸菌症の原因菌を排除することは重要であろう。

生化学的検査結果とシーケンス結果とが食い違ったため、同定不能とした株 (K-29 株) は、生化学的検査法では、表 4 に示すごとく *M. flavescens*、*M. phlei*、*M. vaccae* といった菌種が同定候補として考えられる。しかし、16S rDNA のシーケンスを RIDM のデータベースと比較すると、*M. moriokaense*、*M. pulveris*、*M. goodii*、*M. madagascariense* といった菌種名が同定名候補として判定された。*M.*

*madagascariense* は、37°C 以下の至適温度域をもつといわれているため、浴槽水中での生存は考えにくい。また、集落の性状や色も異なるので *M. madagascariense* は否定されるが、他の菌種は可能性があるため、現在再純化して同定試験をやり直しているところであるため、今回は未同定とした。

## E. 結論

健康人にとっては、ほとんどが日和見感染菌である抗酸菌は、自然界に広く分布している。今回の循環式浴槽の浴用水 68 検体から抗酸菌 19 株が分離された。ヒトに病原性のある *M. avium* 11 株、*M. fortuitum* 1 株が同定され、非結核性抗酸菌症の感染源となり得るので、循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化を検討することが必須である。

## F. 参考文献

1. 久世文幸：結核、第 5 章 非定型抗酸菌症「A 非定型抗酸菌症の基礎」、第 3 版、泉孝英、網谷良一編集、医学書院、東京、1999、273-285.
2. 森亨他、結核の統計 2005 年版、財団法人結核予防会、東京
3. 佐藤茂樹、坂谷光則、山本正彦：わが国における非定型抗酸菌症の疫学—アンケート調査—非定型抗酸菌症研究協議会総会講演記録 (2002 年東京)
4. 坂谷光則：第 79 回日本結核病学会総会教育講演「非定型抗酸菌症」、結核 80 : 25-30, 2005.
5. 齊藤肇、村上和保、石井則久、樫赫間：「24 時間風呂」からの *Mycobacterium avium* complex の検出、結核 75 : 19-25, 2000.

## G. 研究発表

1. 藤井明、河合自立、松田和也、杉山寛治、大畑克彦、鈴木光彰、加藤宏一：循環ろ過式モデル浴槽系内におけるバイオフィーム形成とその洗浄・殺菌について、生活と環境 51 (2) : 67-73、2006.

表1 浴槽水から検出された抗酸菌19株の同定結果

菌株 No.	発育 速度	集落性状		同定結果	
		型	色	生化学的検査法	DDH*
K-21	Slow	Smooth	灰白色	MAC	<i>M. avium</i>
K-22	Slow	Smooth	灰白色	MAC	<i>M. avium</i>
K-23	Rapid	Smooth	黄オレンジ色	Group IV	判定不能(⑨⑩)
K-24	Slow	Smooth	クリーム色	MAC	<i>M. avium</i>
K-25	Slow	Rough	クリーム色	MAC	<i>M. avium</i>
K-26	Rapid	Smooth	黄オレンジ色	Group IV	判定不能(⑨⑩)
K-27	Slow	Smooth	クリーム色	MAC	<i>M. avium</i>
K-28	Slow	Smooth	灰白色	MAC	<i>M. avium</i>
K-29	Rapid	Rough	オレンジ色	Group IV	判定不能(⑥⑩)
K-30	Slow	Rough	灰白色	MAC	<i>M. avium</i>
K-31	Slow	Rough	灰白色	MAC	<i>M. avium</i>
K-32	Slow	Smooth	黄オレンジ色	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>
K-33	Slow	Smooth	黄オレンジ色	<i>M. gordonae</i>	発色せず
K-34	Slow	Smooth	灰白色	MAC	<i>M. avium</i>
K-35	Slow	Smooth	灰白色	MAC	<i>M. avium</i>
K-36	Slow	Smooth	灰白色	MAC	<i>M. avium</i>
K-37	Rapid	Rough	灰白色	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>
K-38	Rapid	Smooth	黄オレンジ色	Group IV	判定不能(⑨⑥)
K-39	Rapid	Smooth	黄オレンジ色	Group IV	判定不能(⑨⑥)

\*DDH: DNA-DNA Hybridization法キット (極東製薬工業) による同定結果

MAC\*\* : *M. avium*-*M. intracellulare* complex

⑥ : *M. scrofulaceum*, ⑨ : *M. avium*, ⑩ : *M. intracellulare*

表2 DDH試験法により同定不能とされた菌株のシーケンス結果

菌株 No	DDH*		RIDM**データベースを参照した分析結果			
	相対類似度 (%)	判定結果	不一致塩基数	類似度	%	シーケンス結果
K-23	73	判定不能(⑨⑩)	4	416/420	99.05	<i>M. phlei</i>
K-26	79	判定不能(⑨⑩)	5	426/431	98.84	<i>M. phlei</i>
K-33	不明	発色せず	7	421/428	98.36	<i>M. gordonae</i>
K-38	77	判定不能(⑨⑥)	5	426/431	98.84	<i>M. phlei</i>
K-39	89	判定不能(⑨⑥)	3	417/420	99.29	<i>M. phlei</i>

\*DDH : DNA-DNA Hybridization法キット (極東製薬工業) による同定結果

⑥: *M. scrofulaceum*, ⑨: *M. avium*, ⑩: *M. intracellulare*

\*\*RIDM : Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms

表3 抗酸菌19株の菌種の内訳

菌種名	株数
<i>M. gordonae</i>	2
<i>M. avium</i>	11
<i>M. fortuitum</i>	1
<i>M. phlei</i>	4
未同定	1

表4 K-29株と同定候補菌種の性状

	発育 速度	集落 性状	集落の色	光発 色性	PNB 培地	EB 培地	PA 培地	PAS培 地黒変	HA 培地	硝酸塩 還元	Tween 80水解	アリルスルファ ターゼ試験	RIDM** identity (%)
K-29	Rapid	Rough	オレンジ色	-	+	-	+	-	-	+	+	-	
<i>M. moriokaense</i>	Rapid	Rough	淡黄色	-	+	+	+	-	-	+	-	+	97.99
<i>M. pulveris</i>	Rapid	Smooth	淡黄色	-	+	+	-	-	-			+	97.50
<i>M. goodii</i>	Rapid	Smooth	灰白~淡黄色	+		-				+		-	96.73
<i>M. madagascariense</i>	Rapid	Smooth	黄色	-					-	-	-	+	96.73
<i>M. flavescens</i>	Rapid	Rough	黄色	-	+	-	+	-	-	+	+	-	95.98
<i>M. phlei</i>	Rapid	Rough	黄色	-	+	-	+	-	+	+	+	-	
<i>M. vaccae</i>	Rapid	Smooth	黄色	-	+	-	+	-	+	-	+	-	

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

レジオネラ属菌迅速測定法の有用性の検討

分担研究者：横浜市衛生研究所 荒井桂子

研究協力者：横浜市衛生研究所 吉川循江、田中礼子、林宏子、山口正

**研究要旨：** レジオネラ肺炎はレジオネラ属菌が増殖した浴槽水から発生したエアロゾルを吸引することで感染すると考えられており、循環水を用いた浴場施設が原因と推定されるレジオネラ肺炎が全国で散発している。浴槽施設からレジオネラ属菌が検出された場合には清掃・殺菌を行い、その後にレジオネラ属菌の不検出を確認するまで営業停止措置が取られる。その際に行われるレジオネラ属菌検査（培養）は結果判明までに7～10日を要すること、また、検査にかかる負担も小さくないなどの問題を抱えている。そこで、培養検査とは異なる遺伝子増幅を利用した迅速測定法2法（LAMP法及びリアルタイムPCR法）の有用性を検討した。

その結果、LAMP法及びリアルタイムPCR法は、採水から前処理を含めて結果判明までに1日以内と迅速であった。重要な点は、培養法と他の2法での判定結果にはかなりの不一致が存在したが、その原因は「DNA検出法では生菌/死菌を分けず検出する」ことによるもので、死菌を検出しない培養法との間に不一致が生じる。培養陰性でありながら高濃度のDNAが検出される状況は自然界には存在せず、そのような試料（施設）は少なくとも検査の直前までレジオネラの増殖があったことが強く示唆される。DNA検査法ではこのような状況を的確に把握することができるわけで、積極的に活用すべきものとする。次年度においてさらに詳細な検討を行うと共に、例数を増やしその有効性を検討する予定である。

A. 研究目的

浴場施設の多くは循環式浴槽を用いており、レジオネラ症防止には浴槽水に増殖するレジオネラ属菌の管理が重要になっている。浴場施設の維持管理が適切に行われているかを確認するために、浴槽水中のレジオネラ属菌数を把握する必要がある。しかし、その検査は培養法で行われ、結果判明までに7～10日を要するため、リアルタイムに状況を把握することが困難になっている。また、レジオネラ属菌が検出された浴場施設が営業を再開するまでに、レジオネラ属菌が検出されなくなったことを確認する必要があるが、その際にも7～10日間結果判明を待たなければならない。この結果判明までの時間を少しでも短縮し、施設の維持管理の改善に寄与する可能性を求めて、

遺伝子増幅を利用した迅速測定法2法（LAMP法及びリアルタイムPCR法）の有用性を検討した。

B. 方法

培養法に比較して短時間で結果が判明すること、比較的安価な装置を使用すること、検出限界値が培養法と同等以上であること等を考慮し、以下の2法を検討することとした。

1. LAMP法（栄研化学社）

LAMPとはLoop-Mediated Isothermal Amplificationの略であり、栄研化学が開発した遺伝子増幅法。標的遺伝子の6つの領域に対して4種類のプライマーを設定し、鎖置換反応を利用して一定温度で反応させ

ることを特徴とする。サンプルとなる遺伝子、プライマー、鎖置換型 DNA polymerase、基質等を混合し、一定温度（65℃付近）で保温することによって反応が進み、検出までの工程を1ステップで行うことができる。DNAを15分～1時間で $10^9$ ～ $10^{10}$ 倍に増幅することができ、高い特異性から標的遺伝子配列のみを増幅し、反応時に副産物として生成するピロリン酸マグネシウムの白濁を検出する。

レジオネラ属菌の検出には、レジオネラ属菌の保持する16S rRNAをコードする遺伝子領域内にLAMP法用のプライマーを設計し開発した専用の試薬キットを使用する必要がある。当該研究においては、以下の試薬と装置を採用した。

使用試薬：Loopamp レジオネラ検出試薬キットE（栄研化学）

使用機器：Loopamp リアルタイム濁度測定装置（栄研化学）

## 2. リアルタイムPCR法

従来のPCR法は、サーマルサイクラーという機器でPCRを行い、目的DNAを増幅した後、増幅産物を電気泳動で解析するという手順で行うが、リアルタイムPCR法では、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した機器を用いて、PCRでの増幅産物の生成過程をリアルタイムで検出し、解析する手法である。増幅産物の生成の過程を連続して行うことができるため、より正確な定量が可能となり、電気泳動を行う必要がないため、解析時間の大幅な短縮が可能となる。当該研究においては、以下の試薬と装置を採用した。

使用試薬：CycleavePCR® *Legionella* Detection Kit (Takara)

使用機器：リアルタイムPCR装置 Smart Cycler® (Cepheid)

本試薬キットは、レジオネラ属菌を網羅的に検出する5S rRNA遺伝子、及び*Legionella pneumophila*のmip (macrophage infectivity potentiator protein) 遺伝子の特定配列を検出するリアルタイムPCR用キットで、検出には特異性の高いとされるサイクリングプローブ法が採用されている。本キットにはmip遺伝子検出用のFAM標識プローブ、5S rRNA遺伝子検出用のROX

標識プローブ、およびインターナルコントロールとインターナルコントロール検出用のTET標識プローブが含まれている。Smart Cycler®で3波長を同時にモニタリングすることで、単一の反応チューブ内でmip遺伝子と5S rRNA遺伝子の同時検出、さらにインターナルコントロールによる偽陰性の判別も可能となっている。

## 3. DNA検出法の検出限界値の検討

### 3.1. 試料の調製

滅菌注射用水に*L. pneumophila* SG1～SG6、*L. bozemanii*、*L. longbeachae*、*L. anisa*の環境水分離株をBCYE $\alpha$ 培地に培養し、それぞれの菌種（株）について1、5、10、50、100 CFU/100mLの各濃度になるように調整した。

### 3.2. 検査方法

検査方法は前処理を含めて栄研化学社及びタカラバイオ社の指示どおりとした。

#### 3.2.1. LAMP法

##### ・濃縮操作

試料200mLを0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターでろ過し、ろ過回収物を2mLに再浮遊した（100濃縮）。

##### ・アルカリ熱抽出

4℃、13,000 $\times$  g、10分間遠心する。約40 $\mu$ L残して上清を除去後、Extraction Solution for *Legionella* (EX Leg) 50 $\mu$ Lを添加し、95℃、15分間加熱処理を行う。氷冷した後、1M Tris-HCL(pH7.0)を8 $\mu$ L添加して混合する。4℃、13,000 $\times$  g、10分間の遠心後に上清をサンプルとした。

##### ・LAMP法

サンプル溶液、陽性コントロール、陰性コントロール各5 $\mu$ Lに試薬を20 $\mu$ L添加し、Loopampリアルタイム濁度測定装置で測定を行った。

#### 3.2.2. リアルタイムPCR法

##### ・濃縮操作

試料100mLを0.22 $\mu$ mのメンブランフィルターでろ過し、ろ過回収物をTaKaRa DEXPAT®中で攪拌し混濁させ

た。← 液量は??

#### ・DNA 抽出

100℃、10 分間の加熱処理後に 25℃で、12,000rpm、10 分遠心する。上清をイソプロパノールとグリコーゲンを分注したチューブへ採り、再び 25℃、14,000rpm、10 分遠心し、上清を捨てる。沈渣にエタノールを入れ（エタノール洗浄）、25℃、14,000rpm、10 分遠心する。上清をを捨て、沈渣を風乾し、サンプルとした。

#### ・リアルタイム PCR 法

サンプル溶液に、陽性コントロール、陰性コントロール、および指定の試薬を添加し、Smart Cycler<sup>®</sup>で DNA の増幅と測定を行った。

#### 4. 相関性及び再現性の検討

リアルタイム PCR 法は定性反応のみならず試料中の DNA 量を定量することができることから、培養法との相関性及び再現性を検討した。当初、既知の濃度の菌液を定量することで検量線を作成した。既知濃度の段階希釈菌液（10、100、1,000、10,000 cfu/100mL）を 3 回ずつ測定してその平均値を用いて検量線を作成した。その検量線を用いて試料中の菌数を算定し、培養法で得られた結果と比較することで両者の相関性及び再現性について検討を行った。

##### 4.1. 試料の調製

BCYE  $\alpha$  培地で継代培養した *L. pneumophila* SG1 の環境水分離株を用いて、滅菌注射用蒸留水に 1、2、5、10、50、100 CFU/100mL となるように添加した。

##### 4.2. 検査方法

###### 4.2.1. 培養法

リアルタイム PCR 法と条件を揃えるため、試料 100mL を 0.22 $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過し、ろ過回収物を 1mL に再浮遊した（100 倍濃縮）。50℃、20 分間の加熱処理を行い、0.1mL ずつ 10 枚の WYO  $\alpha$  平板に塗抹して培養した。

###### 4.2.2. リアルタイム PCR 法

3. の「DNA 検査法による検出限界値

の検討」と同じ方法で検査した。

#### 5. 実試料を用いた検討

##### 5.1. 試料

浴槽水 100 試料（白湯 80、薬湯 10、温泉 10）

##### 5.2. 検査方法

LAMP 法、リアルタイム PCR 法及び培養法に浴槽水をそれぞれ 200mL、100mL 及び 100mL 使用し、前述の方法に従って反応を行った。また、同時に従属栄養細菌数（R2A 培地、20℃ 7 日間培養）、残留塩素濃度（現場測定 DPD 法）を測定した。

#### C. 結果および考察

##### DNA 検出法による検出限界値の検討

各菌種、各濃度を 2 回繰り返して測定を行い、2 回とも陽性と判定された最低菌濃度を表 1 に示した。2 法とも各菌種 5~10 cfu/100mL を検出することが可能で、十分な検出限界値を得た。培養法の検出限界値は通常 10 cfu/100mL とされており、迅速法 2 法は培養法に代わり、定性に使用することが可能であった。

##### 培養法との相関性及び再現性の検討

リアルタイム PCR 法は定性の他、レジオネラ属菌及び *L. pneumophila* の定量が可能である。そこで、培養法との相関性及び再現性を検討した（図 1）。リアルタイム PCR 法は培養法の測定結果と極めて高い相関（ $r = 0.998643$ ）を示した。また、繰り返しの測定により再現性も確認された。

##### 実試料での培養法と迅速法の定性結果比較

定性試験に際して、培養法およびリアルタイム PCR 法での陽性判定は 10 CFU（相当）/100mL 以上とした。培養法と DNA 検査法の定性的な判定結果を表 2 に示した。培養法では陽性が 16 試料、陰性が 84 試料であった。これに対し、LAMP 法では陽性が 40 試料、陰性が 60 試料、リアルタイム PCR 法では陽性が 64 試料、陰性が 36 試料であった。すなわち、LAMP 法では培養法が陰性であった 26 試料が陽性と判定され、培養法で陽性であった 2 試料が陰性と判定された。また、リアルタイム PCR 法では、培養法で陰性の試料のうち 48 試料が陽性と

判定された。なお、リアルタイム PCR では培養陽性の試料が陰性と判定されることはなかった（レジオネラ属菌の陽性率は培養法 16%に対し、LAMP 法 40%、リアルタイム PCR 法 64%）。

培養陰性の試料で LAMP 及びリアルタイム PCR が陽性であった試料の残留塩素濃度を検討したところ、残留塩素が 0.1mg/L 未満であった試料は 2 検体、反対に LAMP 法で陽性となった 12 試料及びリアルタイム PCR で陽性と判定された 26 試料からは 1.0mg/L 以上の高濃度の塩素が検出された。遺伝子検査法では検体に培養可能な生菌のほかに培養不能菌や死菌が含まれれば DNA を増幅する可能性が高いため判定結果に不一致が生じるものと判断された。

一方、培養法が陽性で、LAMP 法が陰性を示した 2 試料（試料番号 6、14）は薄い黒褐色を呈した温泉水（ナトリウム-塩化物・炭酸水素塩温泉）で、フミン質を含んでいることにより DNA の増幅阻害が起きたものと判断された。

#### 培養法とリアルタイム PCR 法による菌数測定

培養法とリアルタイム PCR 法の定量結果を図 2 に示した。リアルタイム PCR 法の検出菌数は、培養法に比較して常に高い値を示した（0.25~500 倍）。このような現象は生菌のみを用いた実験（図 1）では認められず、このことより試料水中には培養可能な生菌のほかに培養不能菌や死菌が含まれているものと解釈された。ただし、2 試料において培養法の結果がリアルタイム PCR 法よりもより高い値（菌数）となった。この 2 試料（試料番号 6、14）は先に述べた LAMP 法で陰性と判定されたもので、フミン質による反応阻害がその原因と考えられた。

培養法及びリアルタイム PCR 法の定量結果と残留塩素濃度の関係を見ると、残留塩素が低く、培養法でレジオネラ属菌が検出されている場合のリアルタイム PCR の定量結果は培養法の  $10^0 \sim 10^1$  倍程度であった。これに対し、残留塩素が高い場合には、当然ながら培養陰性となるが、リアルタイム PCR 法による定量結果からは菌量に換算すると  $1 \times 10^2 \sim 10^5$  CFU に相当した値が得られた。後者は明らかに採水直前に大量の塩

素剤を投入したものと判断されることから、両者ともに管理の不備が指摘できる。

#### リアルタイム PCR 法の定量結果と従属栄養細菌

従来、レジオネラ属菌検査の代替として従属栄養細菌が注目されてきた。しかし、今までの調査では相関を示すデータは報告されていない。今回も、培養法の定量結果と従属栄養細菌数の間に相関は見られなかった。しかし、リアルタイム PCR 法の定量結果と従属栄養細菌数の関連をみたところ、危険率 1% で相関が認められた（ $r = 0.260654$ ）。今後とも、検体数を増やし、情報の精度を高める予定である。

#### 出現頻度の検討

培養法およびリアルタイム PCR 法により試料中のレジオネラ菌数を求め、それぞれの濃度分布を対数正規確率紙上にプロットした（図 3A）。いずれも直線上に分布し、レジオネラの濃度分布は対数正規分布であることが示された。培養法によって得られた菌数に比べリアルタイム PCR の結果から算定した菌数はおよそ 1 ないし 2-log 程度高い値を示した。

残留塩素濃度 0.2 mg/L を境としてそれ以上検出された試料を「塩素有り」とし、それ未満の試料を「塩素無し」として結果を整理した（図 3B）。塩素が検出されなかった 25 試料のうち培養が陰性であった試料は 14 件あり（すなわち 56% までが 10 CFU/100ml 未満に分布した）、良好な施設管理がなされていればレジオネラ汚染は防げることを実証している例といえる。一方、陽性の 11 件の陽性試料からはおよそ  $10^{1-4}$  CFU/mL の範囲で菌が分離された。これに対し、塩素ありとされた試料水 75 検体のうち、5 検体から培養によりレジオネラが  $10^{1-2}$  CFU/100mL のオーダーで分離された。塩素消毒の有り/無しで分離される菌数に 100~1,000 倍程度の差があり、塩素消毒により 2~3log 程度の不活化がなされるものと判断された。

リアルタイム PCR による塩素無し試料 25 件の検査で、そのうちの 9 件が陰性と判定された。残りの 16 件からは菌数に換算して  $10^2 \sim 10^4$  CFU/100mL に相当する DNA が

検出された。塩素有りとなされた 75 試料の DNA の濃度分布曲線は  $10^2 \sim 3$  CFU/100mL 相当の区間で不連続となり、高濃度 ( $10^3$  CFU/100mL 相当以上) と低濃度 ( $10^2$  CFU/100mL 相当以下) の 2 つの集団が存在することが示された。高濃度の DNA が検出された 9 試料の濃度分布は塩素無し試料と重なっていた (図 3B)。この 9 試料について詳細に検討すると、培養陽性が 3 件 (10、30、250 CFU/100mL)、陰性が 6 件であった。高濃度の DNA が検出された群の分布曲線は塩素無し試料のそれとまったく重なること、培養陰性でありながら高濃度の DNA が検出される状況は自然界では考えられないことなどから、試料採取の直前に塩素が投入されたものと判断される。一方、低濃度の集団は  $10^1 \sim 2$  CFU/100ml 相当に集中しており、培養でレジオネラ生菌が検出された試料はなかった。

LAMP 法では DNA 量に換算して 10~50 CFU/mL 相当の低レベルの DNA 試料で陰性となるケースが見られ、リアルタイム PCR との判定に差が生じた。一方、リアルタイム PCR で高濃度の DNA が検出された試料は LAMP 法でも全て陽性と判定され、両者の判定に差が生じることはなかった。

#### D. 結論

- 1 迅速測定法として取り上げた LAMP 法及びリアルタイム PCR 法は、培養法と同程度の検出限界値を示した (表 1.)。
- 2 リアルタイム PCR 法は定量性があり、生菌を用いた実験では培養法との相関は極めて高く、DNA 量から菌数を概算することが可能である (図 1.)。
- 3 実試料 (浴槽水) を用いた試験で、DNA 検出法と培養法の判定結果には大きな差異が認められ、培養法で陰性と判定された試料のうちかなりのものが DNA 検出法で陽性と判定された (表 2.)。この判定の差異は以下のような減員が考えられる。
  - 3.1 DNA 検査法では生菌/死菌の別なく検出することから、死菌を検出しない培養法との結果に違いが生じる。
  - 3.2 レジオネラ由来の DNA が多量 ( $10^3$  CFU/100mL 相当以上の

DNA 量) に存在するにもかかわらず、培養で菌が検出されないような状況は自然状態で存在せず、検体採取の直前に消毒剤を投入したような状況においてのみ発生すると判断される。

- 3.3 いずれにせよ、塩素管理が周到に行われている状況下ではレジオネラの増殖は起こり得ず、従って、DNA 検査法でも陰性と判断される。
- 4 DNA 検査法は浴槽水中のフミンなどにより反応が阻害される恐れがある。
- 5 DNA 検査法は迅速性に優れ、浴槽の管理状況を的確に反映する可能性があることから、引き続き評価を目的にデータの蓄積を図ることが重要と考える。次年度の課題として以下の項目が挙げられる。
  - 5.1 LAMP 法による定量試験の開発
  - 5.2 例数を増やし、培養、リアルタイム PCR、LAMP の 3 方法の比較データの充実に努め、DNA 検査法の実試験への適用の判断とする。

#### E. 参考文献

##### 縣論文。

1. 安中敏光、小島禎、池戸正成、古畑勝則. 2004. LAMP 要による環境水からの *Legionella* 属菌の検出. *Boukinn Boubai* 32(4): 195-201.
2. 井上浩章、野田晃子、縣邦雄. 2004. *Legionella pneumophila* の塩素、過酸化水素殺菌時の PCR 法による検出挙動. *Boukinn Boubai* 32(8): 383-386.
3. 井上浩章、野田晃子、縣邦雄、安中敏光、小島禎、池戸正成. 2004. LAMP 法、PCR 法を用いた浴槽水レジオネラ属菌の迅速検査に関する調査研究. *Boukinn Boubai* 32(10): 481-487.

#### F. 健康危険情報 なし



G. 研究発表  
論文発表

学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

	LAMP 法	リアルタイム PCR 法
<i>L.p</i> SG1	10	5
<i>L.p</i> SG2	5	5
<i>L.p</i> SG3	10	10
<i>L.p</i> SG4	10	5
<i>L.p</i> SG5	5	5
<i>L.p</i> SG6	10	10
<i>L.bozemanii</i>	5	5
<i>L. longbeachae</i>	10	5
<i>L. anisa</i>	10	10

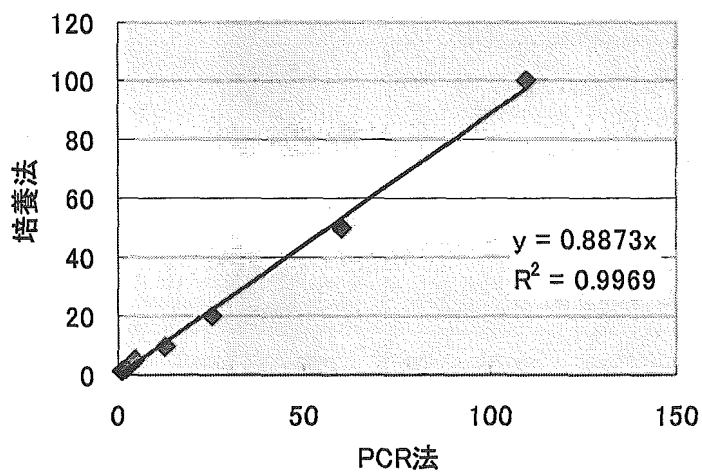


図1 リアルタイム PCR 法と培養法の相関性

表2 培養法と迅速法の定性結果

LAMP法				
		陽性	陰性	計
培養法	陽性	14	2	16
	陰性	26	58	84
計		40	60	100

リアルタイムPCR法				
		陽性	陰性	計
培養法	陽性	16	0	16
	陰性	48	36	84
計		64	36	100

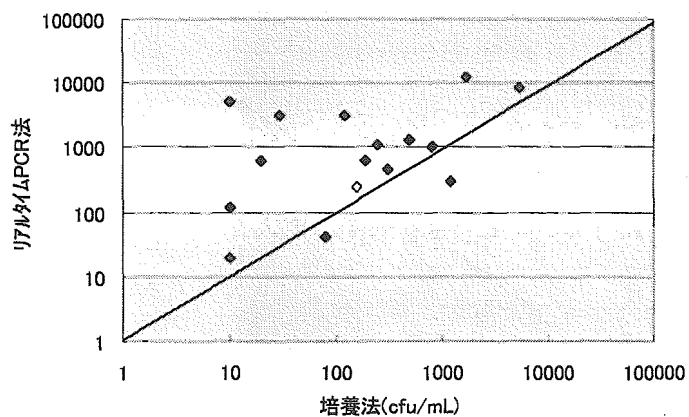


図2 培養法とリアルタイムPCR法の定量結果

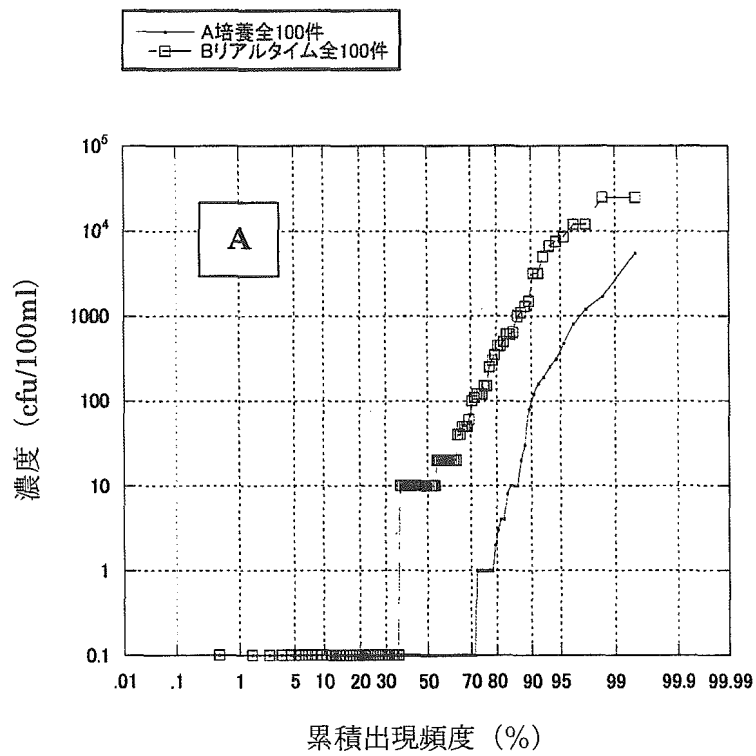


図3 レジオネラ属菌測定値の出現頻度分布

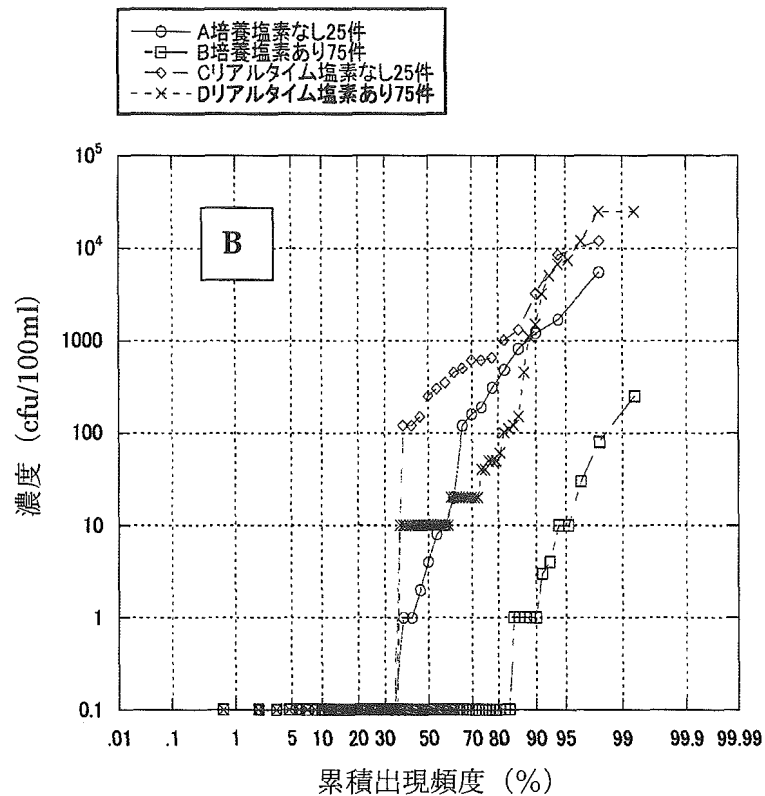


図3 レジオネラ属菌測定値の出現頻度分布

A) 全試料の培養法 (●) およびリアルタイム PCR 法 (□) により得られた試料中の菌数の出現頻度分布を示した (n=100). 両者は平行関係にあり、培養に比べ PCR による測定は 1~2 log 程度高い値を示した.

B) 培養の結果を塩素有り (□: n=75) と無し (○: n=25) に分け、同様に PCR の結果も塩素の有り (×: n=75) と無し (◇: n=25) に分けて出現頻度分布を作図した. 培養結果では、塩素処理により 2~3 log 程度の不活化効果が認められた. 塩素が検出された試料を PCR により測定すると、出現頻度分布曲線は直線性が失われ、明らかに高濃度域と低濃度域で 2 つの異なった群に分かれた. 高濃度域の分布は塩素無し試料の測定結果と重なった. 一方、低濃度域では塩素無し試料よりも 1 log 程度低い値で推移していた. すなわち、これらの群では効果的な塩素管理が行われており、レジオネラの増殖が低く抑えられてたものと考えられた.

表3 浴槽水の各検査結果

試料番号	種類	培養法 cfu/100ml	PCR法	LAMP法	残留塩素 mg/L	従属栄養細菌 cfu/ml
1	白湯	10	20	陽性	0.2	50
2	白湯	10	5000	陽性	1	0
3	白湯	10	120	陽性	<0.1	960
4	白湯	20	610	陽性	<0.1	1200
5	白湯	30	3200	陽性	0.8	62000
6	温泉	80	40	陰性	0.2	10
7	白湯	120	3200	陽性	0.1	49000
8	薬湯	160	250	陽性	<0.1	1100
9	白湯	190	610	陽性	<0.1	1800
10	白湯	250	1100	陽性	0.2	32000
11	白湯	310	450	陽性	<0.1	1200
12	白湯	480	1300	陽性	<0.1	35000
13	白湯	810	1000	陽性	0.1	9000
14	温泉	1200	300	陰性	<0.1	1100
15	白湯	1700	12000	陽性	<0.1	87000
16	白湯	5500	8500	陽性	<0.1	23000
17	白湯	8	350	陽性	0.1	850
18	白湯	4	120	陽性	0.1	760
19	白湯	2	650	陽性	0.1	1500
20	温泉	1	150	陽性	<0.1	220
21	薬湯	1	500	陽性	<0.1	990
22	白湯	1	450	陽性	0.2	1200
23	白湯	1	100	陽性	0.2	860
24	温泉	0	10	陽性	0.4	40
25	温泉	0	10	陽性	0.4	60
26	白湯	0	10	陽性	0.4	65
27	温泉	0	20	陽性	0.8	90
28	白湯	0	20	陽性	0.8	150
29	白湯	0	20	陽性	0.8	160
30	白湯	0	40	陽性	0.8	270
31	白湯	0	50	陽性	1.0	30
32	白湯	0	50	陽性	1.0	50
33	白湯	0	60	陽性	1.0	45
34	白湯	0	110	陽性	1.0	12
35	白湯	0	120	陽性	1.0	0
36	白湯	0	150	陽性	1.0	0
37	白湯	0	1500	陽性	2.0	0
38	白湯	0	6700	陽性	2.0	0
39	白湯	0	7500	陽性	2.0<	0
40	白湯	0	12000	陽性	2.0<	0
41	白湯	0	25000	陽性	2.0<	0
42	白湯	0	25000	陽性	2.0<	0
43	白湯	1	10	陰性	0.6	36
44	白湯	1	10	陰性	0.6	40
45	白湯	1	20	陰性	0.6	60
46	白湯	3	10	陰性	0.6	80
47	白湯	4	10	陰性	0.8	1
48	白湯	0	10	陰性	0.8	4
49	白湯	0	10	陰性	0.8	5
50	白湯	0	10	陰性	0.8	5

表3 浴槽水の各検査結果(つづき)

試料番号	種類	培養法 cfu/100ml	PCR法	LAMP法	残留塩素 mg/L	従属栄養細菌 cfu/ml
51	白湯	0	10	陰性	1.0	6
52	白湯	0	20	陰性	1.0	6
53	白湯	0	50	陰性	2.0	0
54	白湯	0	20	陰性	2.0<	0
55	白湯	0	20	陰性	2.0<	0
56	白湯	0	20	陰性	2.0<	0
57	白湯	0	20	陰性	2.0<	0
58	白湯	0	10	陰性	2.0<	0
59	白湯	0	10	陰性	2.0<	0
60	白湯	0	10	陰性	2.0<	0
61	白湯	0	10	陰性	2.0<	0
62	白湯	0	10	陰性	2.0<	0
63	白湯	0	10	陰性	2.0<	0
64	白湯	0	10	陰性	2.0<	0
65	白湯	0	陰性	陰性	2.0<	0
66	白湯	0	陰性	陰性	2.0<	0
67	白湯	0	陰性	陰性	2.0<	0
68	白湯	0	陰性	陰性	2.0<	0
69	白湯	0	陰性	陰性	1.0	0
70	白湯	0	陰性	陰性	1.0	0
71	白湯	0	陰性	陰性	1.0	0
72	白湯	0	陰性	陰性	1.0	0
73	白湯	0	陰性	陰性	1.0	0
74	白湯	0	陰性	陰性	1.0	0
75	白湯	0	陰性	陰性	1.0	0
76	白湯	0	陰性	陰性	1.0	0
77	温泉	0	陰性	陰性	1.0	0
78	白湯	0	陰性	陰性	1.0	0
79	白湯	0	陰性	陰性	1.0	0
80	白湯	0	陰性	陰性	1.0	1
81	白湯	0	陰性	陰性	1.0	1
82	白湯	0	陰性	陰性	0.8	5
83	白湯	0	陰性	陰性	0.8	6
84	白湯	0	陰性	陰性	0.8	10
85	白湯	0	陰性	陰性	0.8	10
86	白湯	0	陰性	陰性	0.6	25
87	白湯	0	陰性	陰性	0.6	40
88	白湯	0	陰性	陰性	0.6	40
89	白湯	0	陰性	陰性	0.4	20
90	温泉	0	陰性	陰性	0.2	15
91	温泉	0	陰性	陰性	0.2	100
92	温泉	0	陰性	陰性	<0.1	10
93	薬湯	0	陰性	陰性	<0.1	500
94	薬湯	0	陰性	陰性	<0.1	600
95	薬湯	0	陰性	陰性	<0.1	0
96	薬湯	0	陰性	陰性	<0.1	20
97	薬湯	0	陰性	陰性	<0.1	56
98	薬湯	0	陰性	陰性	<0.1	100
99	薬湯	0	陰性	陰性	<0.1	150
100	薬湯	0	陰性	陰性	<0.1	1200

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

アメーバ内増殖がレジオネラ属菌の感染に及ぼす影響に関する研究

分担研究者	八木田 健司	国立感染症研究所 寄生動物部
	泉山 信司	国立感染症研究所 寄生動物部
	倉 文明	国立感染症研究所 細菌一部
研究協力者	下河原理江子	国立感染症研究所 寄生動物部

概要：

レジオネラ感染症の発生病序に関しては感染源の菌汚染の度合いが必ずしも感染の規模と結びつかない“Dose paradox”という問題が指摘されている。これに関しては、一般的な経路とされるエアロゾル感染以外の感染経路を想定する必要があると考えられる。本研究ではレジオネラ属菌のアメーバ内における発育増殖と感染性に関する解析から、これまでに動物実験において感染が成立するとされるおよそ1,000 cfu レベルの菌がアメーバ内で増殖し得ることを明らかにしてきた。本年度は多量のレジオネラ属菌を包含するアメーバ（以下感染アメーバ）の取り込みによって感染が成立する可能性についてマウスを用いた感染実験により検証した。その結果、一個の感染アメーバを吸引したマウスの肺で菌の増殖が確認され、エアロゾル以外の感染経路としてアメーバを介した経路の存在が示された。

また、浴槽水中に放出された菌の生存状況と感染性について検討した。その結果、アメーバから水中に放出されたレジオネラは2ヶ月にわたり生存（培地での増殖活性）するものの、アメーバに対する感染性は短期間のうちに低下することが観察され、実際の浴槽水におけるレジオネラ属菌汚染の特徴の一端が明らかとなった。

A. 研究目的

レジオネラ感染における感染濃度（infectious dose）は、未だに整理、理解がされているとは言い難く、いわゆる“Dose paradox”という問題を提起している。この問題の解明は、レジオネラ感染症の実態を理解するのみならず予防対策上においても重

要な情報となる。本研究は、この問題にはエアロゾル感染以外の感染経路が存在するだろうという想定のもとで、アメーバが感染媒体となる可能性について検討を進めている。昨年度はアメーバ内におけるレジオネラ属菌の増殖性を解析し、アメーバ内ではおよそ1,000 cfu レベルまで増殖することを明らか



にした。すなわち、1個の感染アメーバ中では感染が成立するのに必要な菌量に達していることから、感染アメーバを用いてマウスへの経鼻感染を行い、感染媒体としてのアメーバの重要性を検証した。

併せて、実際の浴槽水等における菌の挙動と感染性との関係を明らかにすることを目的として、浴槽に近似した *in vitro* モデルを作成し、試験水中における菌の生存性とアメーバに対する感染性の経時的変化を調べた。

## B. 研究方法：

### 1. 感染アメーバの動物感染試験

#### 1.1 レジオネラ属菌の調整

実験には *Legionella pneumophila* 80-045 株 (SG 1、臨床分離株) を用いた。同菌株は  $-80^{\circ}\text{C}$  凍結保存材料を BCYE  $\alpha$  培地 (DIFCO 製、#218301) に接種後 3 日間、 $30^{\circ}\text{C}$  にて培養したものを用いた。実験に際しては、滅菌蒸留水を用いて必要濃度に調整した。

#### 1.2 感染用アメーバの調整

実験には *Acanthamoeba castellanii* JAC/E1 株 (角膜炎分離株) を用いた。同アメーバは 5ml の PYGC 培地を入れた  $25\text{cm}^2$  フラスコ (SMILON 製) で  $30^{\circ}\text{C}$  にて継代培養し、実験に際しては 3 日間程度増殖させ栄養体の状態にあるアメーバを用いた。使用の数時間前に栄養体を回収し、フラスコあたり  $5 \times 10^5$  細胞となるように接種した。

#### 1.3 レジオネラ属菌のアメーバ感染

滅菌蒸留水に OD 値  $\approx 0.1$  (約  $10^8/\text{ml}$ ) となるようレジオネラ属菌を調整した菌液 0.5ml を  $5 \times 10^5$  個のアメーバを接種したフラスコ (培地量は 4.5ml に調整しておいた) に加え、アメーバに感染させた。感染後 3 日間

にわたり位相差顕微鏡下で、宿主アメーバの形態変化およびアメーバ内での菌の運動性を観察した。

#### 1.4 感染アメーバの単離

感染アメーバはマイクロマニピュレーションにより単離し、微量遠心管 (1.5ml) に予め入れておいた  $40\mu\text{l}$  の生理食塩水に移した。単離後速やかにマウスに投与した。この間にアメーバの崩壊が起きないことを確認した。

#### 1.5 マウス感染試験

2 系統のマウス、A/J (感受性) ならびに C57B (抵抗性) を用いた (両系統ともに SLC より購入)。いずれも 6-8 週齢のオスを用いた。マイクロマニピュレーションにより 1 個の感染アメーバを単離し、直ちに  $40\mu\text{l}$  の生理食塩水に再浮遊し、その全量を経鼻的にマウス投与した。感染は麻酔下で行った。感染後 0 日 (投与直後 30 分)、2 日目、4 日目に、各群 2 頭ずつのマウスから肺を全摘出し、これを均一にホモジネートした。生理食塩水を加え全量を 1ml に調整後、その  $20\mu\text{l}$  を BCYE  $\alpha$  培地に接種し、 $35^{\circ}\text{C}$  で培養して菌数測定を行った。対照群として非感染アメーバを投与した群、およびレジオネラ菌株 (BCYE  $\alpha$  培地で  $30^{\circ}\text{C}$ 、2 日間培養したもの。  $10^4$  が肺に到達するように菌数を調整した) のみ投与した群を準備し、2 日目に各マウス 2 頭を検体採取した。またマウス感染用に調整した感染アメーバ試料より 5 つアメーバを単離し、昨年度と同様の方法でアメーバ 1 細胞あたりの菌数を測定した。

### 2. 塩素除去水道水とアメーバ内増殖レジオネラ属菌を用いた *in vitro* モデル実験

## 2.1 試験水の調整

実験には浴槽モデル実験という目的から、標準的な水質を有する浴槽水として一般的水道水を用いた。実験室蛇口より水道水 500ml をガラス製メディウムボトル (500ml 容量) に採取し、残留塩素の除去および滅菌を兼ねて 121°C、30 分間のオートクレーブを行った。室温まで冷却した後、10ml を用いて残留塩素 (残塩) 濃度を測定した。なお残塩測定は HACC 社の測定キット (DPD 比色法) を用い、キット内光度計により 0.00～0.02mg/L であることを確認した。この塩素除去した滅菌水道水を本実験の試験水とした。

## 2.2 レジオネラ属菌の調整

「1.1 レジオネラ属菌の調整」と同様に行った。

## 2.3 感染用アメーバの調整

「1.2 感染用アメーバの調整」と同様に行った。

## 2.4 アメーバ内増殖レジオネラ属菌の調整

「1.3 レジオネラ属菌のアメーバ感染」と同様にして菌をアメーバに感染させ、アメーバ内で運動する菌が観察された時点で穏やかに感染アメーバを培地とともに 15ml 遠心管に回収した。培地中に浮遊する遊離の菌を除去するために、5ml の PYGC 培地で遠心洗浄 (500 r p m、5 分間) を 2 回繰り返した。沈さとして得られたアメーバは上述の試験水 5ml で浮遊させ、その浮遊液を新しい 25cm<sup>2</sup> フラスコへ移した。低張な水道水中に暴露したことで感染アメーバが次第に崩壊し、内部の菌を放出することを顕微鏡的に確認した。フラスコ内でのインキュベーションは 30°C で 1 時間行い、ほとんどのアメー

バが崩壊したところで菌をアメーバ残渣から分離するために菌浮遊液を 15ml 遠心管に移し、低速 (2,000 r p m) で 10 分間遠心した。遠心後、上清を 4ml 回収し、実験に供した。

## 2.5 アメーバ内増殖菌の試験水への暴露

試験水 200ml をガラス製メディウムビン (300ml 容量) に分注し、インキュベータ内にて保温 (25°C あるいは 42°C) した。菌は浴槽水中では均一に浮遊分布していることを想定して、メディウムビン内には小型のテフロン製スターラーを入れ、試験水を常時攪拌した。また攪拌により水温管理の安定を図った。なお攪拌には小型スターラーを用い、回転数はその最低値に設定した。この温度管理された試験水ボトルに前述のアメーバより放出された菌の浮遊液を添加した。

## 2.6 試験水中の菌数の測定

試験水への添加時を 0 日として経時的に試験水より 0.1ml を採取し、新鮮な試験水で 10 倍希釈系列を作製した。各希釈段階につき 1ml を調整し、その 100 μl を BCYE α 培地に接種し 35°C にて培養した。測定したコロニー数より試験水中の菌数 (cfu/ml) を算定した。

## 2.7 試験水中の菌のアメーバに対する感染性評価

「1.2 感染用アメーバの調整」と同様の方法で培養した  $3 \times 10^5$  個のアメーバをフラスコに接種した。栄養体の接着を確認後、PYGC 培地を 2.5ml 残して除去し、そこに試験水 2.5ml を加え十分に攪拌し、30°C にて培養した。なお経時的な感染性の変化を調べるため、原則として「2.6 試験水中の菌数の測

定」と同時に試験を行った。アメーバへの感染の判断は顕微鏡観察により行った。アメーバに感染した菌は2日後には菌塊として観察できる大きさに発達する。培養期間が2日を超えるとアメーバの崩壊が始まることから、培養2日でアメーバを回収した。アメーバ浮遊液は1度滅菌PBS(-)で遠心洗浄(500rpm, 5分間)してPYGC培地を除去した後、およそ200 $\mu$ lのPBS(-)に再浮遊させて、その10 $\mu$ lをスライドグラス上に径1cm程度となるよう塗布し、空気乾燥させた。次いで、メタノール固定、ギムザ染色を行い、1,000個程度のアメーバを観察し、レジオネラの感染率を求めた。

## C. 研究結果

### 1. 感染アメーバ投与によるレジオネラ属菌の Maus 感染性

感染アメーバを経鼻感染させたマウスの肺からのレジオネラの回収状況を図1Aに示した。併せて、過去に共同研究者が行ったBCYE $\alpha$ 培養菌を用いた Maus への感染実験の結果を図1Bに示した。Maus への投与菌数は感染アメーバ投与群で10<sup>3</sup>台、BCYE $\alpha$ 培養菌群では10<sup>4</sup>台であった。

BCYE $\alpha$ 培地で増殖させた菌を感受性(A/J)、および非感受性 Maus (C57B)に経鼻感染させた場合、A/J Maus では1日後の肺で菌の増殖が観察され、その後、2日目まで肺内の菌数が同程度に維持された後に3日から徐々に減少に転じた(図1B、▲)。非感受性 Maus (図1B、△)では1日目で菌の増殖が見られるものの2日目から減少に転じ、その結果、2日目の肺内の菌数は感受性 Maus (A/J)との間で1log<sub>10</sub>以上の差となった。これに対して、今回の感染アメーバを用いた感染実験では、レジオネラ感受性マ

ウス(A/J)の肺からの菌の回収状況は0日を10<sup>3</sup>個として、2日目には10<sup>4</sup>個、4日目には10<sup>2</sup>個が回収された(図1A、●)。4日目の菌数は2log<sub>10</sub>程度減少して10<sup>2</sup>個が回収された。一方、非感受性のC57B Maus 肺からは2日目に10<sup>3</sup>個、4日目では10<sup>2</sup>個が回収された(図1A、○)。すなわち、感染アメーバを用いた Maus への感染実験においてBCYE $\alpha$ 培養菌を用いた結果とほぼ同様の結果が得られ、感染後2日目には感受性と非感受性 Maus でおよそ1log<sub>10</sub>(0.82log<sub>10</sub>)程度の菌数の差が観察された。その後の肺野における菌の消長は感受性 Maus では2日間でおおよそ2log<sub>10</sub>(1.81log)の減少が認められるのに対して、非感受性 Maus ではおよそ1log<sub>10</sub>(1.13log<sub>10</sub>)の減少に留まった。なお、アメーバ由来のレジオネラを用いた感染実験で培養由来菌を用いた場合に比べ非感受性C57B Maus での菌数の減少速度が若干遅い傾向が見られている。この点に関しては引き続き検討し、確認を行う予定である。

### 2. アメーバから遊出したレジオネラの生存性ならびに感染性の継時変化

培地での増殖性:

水中に放出されたのちのレジオネラの活性の変化を検討すべく、塩素を含まない無菌水200mlにアメーバから遊出させたレジオネラを $\sim 5.8 \times 10^5$ 個/mlとなるように調整し、ガラス製メディウムビン(300ml容量)中で攪拌しながら42°Cで、インキュベートし、継時的に生菌数とアメーバに対する感染性を調べた(図2)。生菌数の測定はBCYE $\alpha$ 培地での培養により得られたコロニー数から算定した。継時的に採取し、培養法により生菌数を測定したところアメーバから遊出したレジオネラは直後から3週間までは検出菌数はほぼ接種菌数と変わらず、増殖

能の変化は認められなかった。その後、4週以後になると生残菌数に低下傾向が現れ、8週では1～2log<sub>10</sub>程度の菌数の低下が見られたもののこの時点で10<sup>4</sup>～10<sup>5</sup>/mlのレジオネラが培養で検出された。滅菌水中にインキュベートされた菌の形態は実験期間を通して短桿菌状で(図3A、B)、BCYE $\alpha$ で培養した際に観察されるようなフィラメント状の菌体(図3、C)は観察されなかった。

#### アメーバへの感染性：

アメーバへの感染性の検討は、10<sup>5</sup>個のアカンソアメーバを含む25cm<sup>2</sup>の培養フラスコに被検対象のレジオネラ(アメーバから遊出させたレジオネラ)を $\sim 1 \times 10^6$ となるように加え、2日後にレジオネラの感染したアメーバ数から換算した。この方法では24cm<sup>2</sup>のフラスコの中に10<sup>5</sup>個のアメーバと10<sup>6</sup>個のレジオネラを共存させている。この時、アカンソアメーバの直径をおよそ20 $\mu$ mとして、1個のアメーバの面積を3.14 $\times 10^2 \mu$ m<sup>2</sup>、アメーバ全体でおよそ0.3cm<sup>2</sup>とした。ここから、フラスコ全体の面積のうちアメーバによって覆われる面積は全体の1.3%と計算される。仮に、アメーバが一日に自分の体表の10倍の面積を移動するものとするとならばフラスコの底面積の13%を覆うことになり、この面積中に落下するレジオネラの菌数、すなわちアメーバと遭遇するレジオネラ菌数は1.3 $\times 10^5$ 個となり、アメーバとレジオネラとがほぼ1:1の割合となるものと想定された。この前提で、図2のアメーバの感染率からレジオネラの感染性を評価すると、アメーバから遊出した直後のレジオネラはアメーバに対する感染性が高く、平均で50%(30.5～81.9%)の菌が感染性を示したものと推測された。同様に、1日後では60%(51.8～67.3%)、2日目では9%(7.4～10.7%)、4日目では5%

(0.5～10.3%)と極めて短期間のうちにアメーバへの感染力が消失することが示された。

なお、アメーバから遊出したレジオネラのほとんどは極めて短期間のうちに感染性を消失するものの、8週間の実験期間中を通して常にごく僅かなアメーバの感染が確認された。その形態は感染性の高い菌の増殖パターン(図4A)と変わるところは無かった(図4B、C)。

#### D. 考 察

レジオネラ感染症の発生機序に関しては、感染源の菌汚染の度合いが必ずしも感染規模と結びつかない“Dose paradox”があり、一般的に想定されるエアロゾル感染以外の感染経路を想定する必要があると考えられる(Harbら、2000)。本研究において感染アメーバのマウスに対する感染実験を行った結果、感受性マウスA/J系統の肺組織内におけるレジオネラ増殖が確認された。アメーバ1細胞が内包し得る菌量によって感染が成立することが示されたことは、エアロゾル以外の感染経路としてのアメーバの介在を強く示唆する。また感染実験の知見として、試験数が少ないので統計的な判断は難しいが、感受性のA/Jマウスまた抵抗性のC57Bマウスにおいても、感染アメーバ由来のアメーバ内増殖菌の方がBCYE $\alpha$ 培地増殖菌よりもマウス肺からの排除が遅い傾向が示された。アメーバ内増殖が菌の感染性あるいは体内における生存能力に影響し、さらには感染の強さにつながっている可能性も示された。アメーバ内増殖菌はBCYE $\alpha$ 培養菌と比較して培養細胞に対する感染性が高いという報告(Cirilloら、1994、Brielandら、1996、1997)は、今回の我々の実験データを支持している。抗体価の上昇や発症度といった個体レベルに及ぼすアメーバ内増殖の影響に関