

厚生労働科学研究費補助金
健康科学総合研究事業

生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究

平成 17 年度
総括・分担研究報告書

主任研究者 吉田 真一

平成 18 年 (2006 年) 3 月

目次

I. 総括研究報告書

- 生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究 1
吉田真一

II. 分担研究報告書

1. 環境中のレジオネラ汚染実態の調査・研究 9
古畑勝則
2. アルカリ領域における塩素の *Legionella pneumophila* に対する消毒効果と塩素
損傷レジオネラの病原性に関する研究 13
宮本比呂志
3. レジオネラ新規病原因子の探索研究 21
三宅正紀
4. レジオネラに対する抗体計測法の作成に関する研究 27
江崎孝行
5. レジオネラ肺炎診療の現状に関する研究—レジオネラ肺炎診療の現状と
今後の課題について 29
田口善夫
6. 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— 35
青木洋介

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 37

IV. 研究成果の刊行物・別刷 39

I. 総括研究報告書

生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究

吉田真一

生活環境におけるレジオネラ感染予防に関する研究

主任研究者 吉田 真一 九州大学大学院医学研究院細菌学分野

研究要旨

本研究は生活環境におけるレジオネラ感染を予防するために、1)レジオネラの自然界における分布と生態を明らかにする、2)レジオネラの性質とくに病原性の機序とその多様性を知る、3)環境中および臨床検体からのレジオネラ迅速検出法と患者の迅速診断法を開発する、4)レジオネラ感染に対する生体防御の破たんとその病態を解明する、5)レジオネラ感染症の臨床疫学的データを蓄積し、有効な診断、治療方法を明らかにするとともに、臨床疫学的解析に基づくレジオネラ感染症の確率的診断法を開発する、ことを目的としている。平成 15 年度から継続しており、これまでの 2 年間の成果は報告済みである。平成 17 年度も上記の目的のために関連する研究を継続し、主に以下のような成果をあげた。

1. 生態に関する研究 *Legionella pneumophila* に関する分子疫学的研究の一環として、温泉水から分離した *L. pneumophila* 1 菌株について RAPD-PCR 法を用いて UPGMA クラスタ解析を行った。類似度 90%以上で類別を行ったところ 18 群に分けられた。類似度 75%で分けると北海道グループ、関東甲信越・東海地方グループ、および中国地方グループの 3 群に類別された。RAPD-PCR 法は PFGE 法に比べてバンド数が少なく、本菌の血清型より下の分類を行うために優れており、感染源、感染経路の特定に有用な分子疫学的解析であることが示された。

2. 病原性に関する研究

i)代謝の研究 一般に、病原細菌における様々な蛋白質の発現は菌の増殖相に依存して制御されていることが知られている。対数増殖後期における *L. pneumophila* は、ストレス耐性、細胞毒性、運動性、ファゴリソソーム形成阻害能などの病原性に関与する能力の上昇が見られ、*L. pneumophila* の病原性を制御する因子の発現調節が増殖相に依存してなされていると推察されている。本研究において、2D-DIGE (2 Dimensional Differential Image Gel Electrophoresis) 解析により、対数増殖期及び対数増殖後期の菌体蛋白質の発現量を比較解析し、菌の新規病原因子となりうる蛋白質を網羅的に探索した。*L. pneumophila* の対数増殖期及び対数増殖後期で有意に発現量の差異が認められる菌体蛋白質を合計 106 個検出した。同定された蛋白質の約 8 割が対数増殖後期にて発現が増加しており、その中には解糖系、TCA 回路や脂質代謝に関連した酵素が多く含まれていた。*L. pneumophila* は本来糖の発酵を行わず、エネルギー源として主にアミノ酸を利用することが知られているが、今回の結果より、対数増殖後期ではアミノ酸の枯渇によって *L. pneumophila* がアミノ酸以外のものをエネルギー源として利用する可能性が推測される。このことは栄養が十分に供給されない感染宿主内で菌が宿主のエネルギー産生系を利用して生存、増殖する可能性を示唆するものであった。また、その他にストレス蛋白質、鞭毛構成蛋白質、twitching motility あるいは走化性に関連する蛋白質の発現上昇が見られ、これらは既知の病原因子との機能的関連が類推され、新規病原因子となりうる可能性が推察された。

ii)病原因子の研究 *L. pneumophila* の *icmN* 遺伝子は鞭毛の発現を支配し、菌の上皮細胞への定着・侵入に関連することを明らかにした。*L. dumoffii* の *traC* 遺伝子は上皮細胞内への侵入を支配していることを明らかにした。

3. 検査法に関する研究 レジオネラに対する抗体価を計測する方法として *Legionella pneumophila* serogroup 1 の菌体を使用した間接蛍光抗体法や、全菌体を使った ELISA 法による抗体計測が実施されているが、そのほかの血清型の計測は通常は行われていない。本研究でわれわれはレジオネラの 7 種類の蛋白抗原

を発現させ特異的な抗体を計測する方法を作成してきた。しかしこの方法では各血清型に対応する抗体の計測ができないので、本年度は6種類のレジオネラの血清型に対応する抗体の計測を行う方法を作成した。

L.pneumophila の血清型 1 から 6 までの標準株の LPS 抗原を精製し、6 種類の異なった蛍光ビーズに固定し、一回の検査で 6 種類の抗体を計測できるマルチプレックス蛍光ビーズアレイ法を作成した。

4. 感染率の年齢差・男女差に関する研究 レジオネラ感染（肺炎）は高齢者に多く、また男性が女性よりも罹患が多いことがわかっている。その原因を解明するために老齢マウスを用い、個体レベル、細胞レベルで感染の感受性を比較した。個体レベルでは差を検出することはできなかったが、細胞レベルで、雄マウスのマクロファージは雌マウスのマクロファージよりもレジオネラの増殖を許すことが明らかとなった。

5. 感染予防に関する研究 アルカリ領域における塩素の *Legionella pneumophila* に対する消毒効果と塩素損傷レジオネラの病原性に関する研究を行った。塩素の殺菌能は高 pH になるほど低下することが確認されたが、いずれの pH でも一旦減少した菌数がその後増加する現象が認められた。蛍光染色法を培養法と併用することで、この現象は「塩素消毒により菌が損傷を受け、生きているが培養できない状態に一時的に陥っている」ことに起因することが判明した。また、生きているが培養できない状態の塩素損傷菌はモルモットに対する病原性を失っていることも明らかとなった。培養法で検出できない状態の塩素損傷菌が病原性を示さないという知見は、塩素消毒が推奨されている浴槽水においては現行の培養法によるレジオネラ検出基準（検出限界以下）が妥当であることを示している。また、「培養不能状態に陥った塩素損傷菌が一時的に培養能を回復する」という知見は、塩素消毒は単回施行では不十分であり、連続的に行うことで塩素濃度を継続的に維持する必要があることを示している。

6. 確率診断法に関する研究 レジオネラ属菌への集団曝露事例では、健康被害調査対象者が多数にのぼるため、レジオネラ肺炎を疑った通常の診療（問診、血液検査、X線検査、喀痰検査）を一律に施行することは医療財源観点からその実効が容易ではない。本研究では過去の集団感染事例の疫学的調査データをもとに、曝露者の臨床的背景と尿中レジオネラ抗原検査を組み合わせることにより、本感染症の定量的診断確率を求めることを目的とした。

臨床疫学的診断手法の一つである Bayes 解析による診断確率の算出法について検討した。問診項目として 1) 発熱、2) 喫煙歴の有無、3) 基礎疾患、4) 飲酒歴の 4 項目を選択し、これらの有無別の組み合わせでレジオネラ症の検査前確率を計算した。その後、尿中抗原検査結果により検査後確率を計算した。確率は各因子の陽性尤度比あるいは陰性尤度比を乗じることにより求められる。上記の 4 問診項目の感度・特異度および尤度比については前年度の研究報告書に記載されている。臨床因子の解析結果より、曝露者の性別に異なる診断確率フローチャートを作成した（総合研究報告書に記載）。男性では、問診結果から求められる検査前診断確率が 50%を超える者を対象に尿中抗原検査を施行し、その検査後確率が 50%を超える場合に要医療と判定することが推奨される。女性では、問診後の検査前確率が 80%を超える場合には、尿中抗原検査を施行せずに（あるいは検査結果に関係なく）要医療と判定して支障がないものと考えられた。Bayes 解析による診断精度を高めるには、今後は“罹患あり”だけでなく、“罹患無し”の者についての臨床情報の収集が必要である。これは診断因子の特異度に正確を期すためである。臨床疫学的診断手法は、客観性・再現性において優れており、短時間に多数の健康被害状況をスクリーニングするに際し有用であると思われる。特定地域・環境における集団感染症への一次的医療対応がこのスクリーニング法の良い対象となる。

7. 臨床的診断・治療に関する研究 レジオネラ肺炎の診療の現状と今後の課題について、われわれが行ってきた実地臨床研究に文献的な考察を加えて検討した。本疾病は本邦の市中肺炎のなかでは欧米と比較し必ずしも発生頻度は高いとはいえないが、1999 年のいわゆる感染症新法施行と集団発生事例報告の増加と社会問題化などにより、疾患の認知度が高まった。また診断については迅速性に優れた尿中抗原検査が普及し、治療については奏効性や安全性の面でキノロン系薬の普及が覗えた。今後は、可能ならば自治体への実際の報告症例の情報開示を可能にするなど疫学的検討機会の拡大と、実地臨床における特異的診断方法の更なる普及により重症例以外の症例も把握することで、本邦におけるレジオネラ肺炎の現状と今後の展開が更に検討可能になると考えられた。

研究分担者

江崎孝行（岐阜大学大学院医学研究科・教授）

宮本比呂志（佐賀大学医学部・教授）

古畑勝則（麻布大学環境保健学部・助教授）

田口善夫（天理よろづ相談所病院呼吸器内科・部長）

三宅正紀（静岡県立大学薬学部・講師）

青木洋介（佐賀大学医学部・講師）

A. 研究目的

本研究は生活環境におけるレジオネラ感染を予防するために、研究要旨の冒頭に記載する目的をかかげ研究を継続してきた。平成 17 年度はこの目的に沿って、以下のような目的で研究を行った。

- 1) 分子疫学的研究の一環として、温泉水から分離した *L.pneumophila* 1 群株について RAPD-PCR 法と PFGE 法を比較し、どちらが感染源、感染経路の特定に有用な分子疫学的解析であるかを検討する、
- 2) レジオネラの病原因子の探索と病原性発現の機序、その属内の多様性を知る、
- 3) 環境中および臨床検体からのレジオネラ迅速検出法と患者の迅速診断法を開発する、
- 4) レジオネラ感染に対する感受性の年齢差・性差の原因を解明する、
- 5) 塩素消毒の pH による効果のちがいと、消毒剤に接触したレジオネラの病原性について、
- 6) 臨床疫学的解析に基づくレジオネラ感染症の確率的診断法を開発する、
- 7) レジオネラ感染症の臨床疫学的データを蓄積し、有効な診断、治療方法を明らかにする、ことを目的とした。

B. 研究方法

レジオネラの分離・同定には細菌学的手法を用い、細胞への感染実験、細胞内増殖実験には形態学的、分子遺伝学的手法、病原性の研究には老齢マウスへの感染実験を行った。迅速検出、迅速診断のために DNA チップと抗原チップを開発した。臨床疫学的研究はアンケート調査を行うと共に、臨床的パラメーターのレジオネラ感染症診断寄与度について解析を行った。

1. RAPD-PCR 法による遺伝学的検討: RAPD-PCR 法は、Bansal らの方法に準拠して以下の方法で行った。供試菌株は 2003 年から 2004 年にかけて全国各地の温泉水から分離した *L.pneumophila* 血清群 1 群 40 株を用いた。DNA の抽出、PCR 法、電気泳動、RAPD-PCR パターンの解析を行った。供試菌株の RAPD-PCR パターンをスキャナで取り込んだ後、RAPD-PCR 画像データについて解析ソフト(Phoretix 社 : 1DAdvanced version 5.00)により、株間のクラスター解析を行い、UPGMA 法により系統樹を作成した。

2. 病原性に関する研究方法

- i) プロテオーム解析 *L. pneumophila* JR32 株由来のタンパクの二次元電気泳動、Cy Dye による標識、MALDI-TOF MS (ultraflex, Bruker) を用いて蛋白質の同定を行った。
- ii) Tn mutagenesis によって作成した *L. pneumophila* の *icmN* ノックアウト株、*L. dumoffii* の *traC* ノックアウト株を用いて、細胞への接着、侵入、細胞内増殖を観察した。

3. 検査法開発の方法

L.pneumophila の血清型 1 から 6 までの標準株の LPS 抗原を精製し、6 種類の異なった蛍光ビーズに固定し、一回の検査で 6 種類の抗体を計測できるマルチプレックス蛍光ビーズアレイ法を作成した。

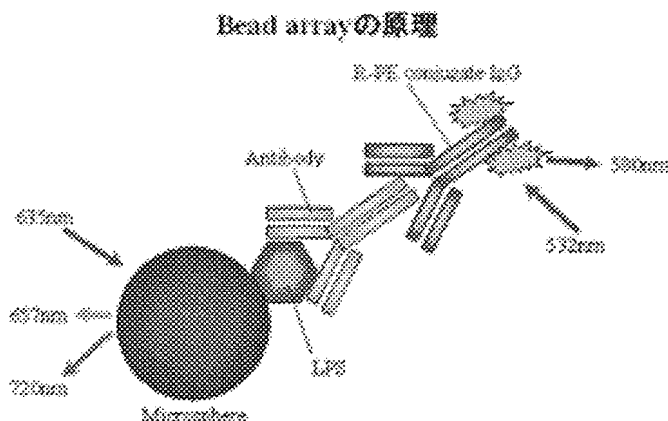


図1. Beads アレイの原理図

4. 感染に対する感受性の年齢差、性差に関する研究

マウスへの感染実験を行い、発病、生死の率を観察した。マクロファージへの感染実験を行い、細胞内での増殖を測定した。

5. 消毒効果をみる方法

塩素接触試験を行った。BCYE 培地で3日間前培養した菌株を、pH 8.0 から pH 10.0 に調整した 3mM リン酸緩衝液に約 5×10^6 CFU/mL になるよう懸濁した。別途、各 pH のリン酸緩衝液に次亜塩素酸ナトリウムを適宜添加して遊離塩素濃度が約 1.0 ppm (pH 9.2 と 10.0 での実験では遊離塩素濃度が約 2.0 と 4.0 ppm の塩素溶液も作成) の塩素溶液を作成し、同一の pH の菌懸濁液と塩素溶液を等量混合してレジオネラと塩素を接触させた。塩素接触静置中、2分または5分間隔で 0.01M (終濃度) のチオ硫酸ナトリウム液を添加してレジオネラと塩素の接触を停止し、試験液を適宜希釈して BCYE 培地に塗布し、37℃ で培養した。

2重蛍光染色法による菌数計測は CFDA アセトン溶液 (終濃度 150mg/ml) とエチジウムブロマイド水溶液 (終濃度 100 mg/L) を加え染色によった。エチジウムブロマイド陽性菌数、CFDA 陽性菌数をそれぞれ、全菌数、生菌数と判定した。

塩素損傷菌のモルモット感染実験は、pH9.0, 遊離塩素濃度 0.7 ppm の条件で塩素に 17 分間接触させたレジオネラ菌液(生菌数は 7.4×10^4 cells/mL で培養可能菌数は 10 CFU/mL 未満) を 3 匹のモルモットの腹腔内に 5 mL ずつ注射し、発熱の有無を一週間観察した。

6. 定量的診断確率を求める方法

臨床疫学的診断手法の一つである Bayes 解析による診断確率の算出法について検討した。問診項目として 1) 発熱、2) 喫煙歴の有無、3) 基礎疾患、4) 飲酒歴の 4 項目を選択し、これらの有無別の組み合わせでレジオネラ症の検査前確率を計算した。その後、尿中抗原検査結果により検査後確率を計算した。確率は各因子の陽性尤度比あるいは陰性尤度比を乗じることにより求められる。上記の 4 問診項目の感度・特異度および尤度比については前年度の研究報告書に記載されている。

7. 臨床的研究方法

市中肺炎におけるレジオネラ肺炎の臨床の現状を検討するために、天理よろづ相談所病院にて 2004 年 5 月から 2005 年 8 月までに 92 例の市中肺炎症例について原因微生物の前向き検討をおこなった。また、最近の本邦及び海外におけるレジオネラ肺炎の動向を併せて文献的にも検討した。

(倫理面への配慮)

研究は院内のみで行い、患者同意を事前に得て行った。なお情報伝達管理は一括して分担研究者が行い、結果集計に関わる業務も一括して分担研究者が行った。動物実験は、「動物の愛護および管理に関する法律」(昭和 48 年)、「大学における動物実験について (通知)」(昭和 62 年文学情第 141) 等、および各研究機関の動物実験倫理指針に基づき、動物愛護の観点から動物に苦痛を与えないように実施した。

C. 研究結果

1. *L.pneumophila* 1 群の RAPD-PCR 像と UPGMA クラスタ解析

供試菌株の RAPD-PCR 像をもとに UPGMA クラスタ解析を行ったところ、類似度 90%以上で 18 群に類別された。地域別では、それぞれ地域別によって高い類似性を示した。また、類似度 75%で分けると北海道グループ、関東甲信越地方と東海地方グループ、および中国地方グループの 3 群に類別された。

2. 病原性

2-1. 2D-DIGE 解析システムにより、*L. pneumophila* JR32 株の対数増殖期及び対数増殖後期で発現量に差異が認められる菌体蛋白質を検出した。ゲルイメージの解析には DeCyder Differential Analysis Software を利用し、蛋白質スポットの検出、ゲル間のスポットマッチング、スポット強度の定量化と標準化、及び Student's t-test による有意差検定を行った。その結果、各ゲル平均 2145 個の蛋白質スポットを検出し、また同時に流した 3 枚のゲルの標準ゲルに対するマッチング数は平均 1399 個であった。そのうち Student's t-test で $t < 0.05$ かつ Ratio (対数増殖期に発現した蛋白質スポットの蛍光強度に対する対数増殖後期に発現した蛋白質スポットの蛍光強度比の絶対値) ≥ 1.5 を満たし、対数増殖期と対数増殖後期で有意に蛋白質の量的変動が認められたスポット合計 104 個を検出した (対数増殖後期で発現増加が認められたスポット 88 個; 減少したスポットが 16 個)。それらスポットについて、MALDI-TOF MS により質量分析を行い、得られた MS データと MS/MS により得られたペプチド配列タグを元にデータベース検索 (NCBI Inr) を行い、蛋白質スポット合計 80 個を同定した。

2-2. *Trn* mutagenesis によって作成した *L. pneumophila* の *icmN* ノックアウト株は、鞭毛を形成できないこと、上皮細胞への侵入能が低下していた。一方、*L. dumoffii* の *traC* ノックアウト株は細胞への、侵入能が低下したものの細胞内増殖能は保っていた。

3. 検査法

蛍光ビーズに固定したレジオネラの 6 種類の LPS 抗原を使って、市販のウサギ工血清 (デンカ生検) を使って有効性を確認した。さらに保存してあるレジオネラの患者血清による測定でも特異的な反応が得られた。

4. 感染に対する感受性の年齢差、性差に関する研究の結果

老齢マウスと若いマウスのレジオネラ感染に対する感受性を経鼻感染によって観察したが、投与菌数が少なかったため、マウスの死亡が観察されなかった。そこでマクロファージ内での菌の増殖を比較した。老齢雄マウスのマクロファージは老齢雌マウスのマクロファージよりも *L. pneumophila* の増殖を許した。

5. 塩素消毒の結果

高 pH では塩素が効きにくいことが培養法で確認されたが、塩素接触時間が長くなるほど減少すると予測された CFU が、一時的に増加する現象が観察された。このことは塩素消毒によりレジオネラが生きているが培養できない損傷菌に陥ることを示唆している。蛍光染色法を培養法と併用した場合の塩素接触試験の結果はレジオネラが塩素消毒により培養法で検出されないが生きている損傷菌に陥ることを示した。また、培養法で不検出という検査結果から、塩素消毒を中断すると、このような損傷菌が培養可能に回復する可能性があることを示唆した。

塩素損傷菌を使用したモルモット感染実験では、発熱の有無を一週間観察したが、いずれのモルモットも発熱しなかった。培地での増殖能を失った損傷菌は生菌であるが、病原性を失っていることが示唆された。塩素消毒が推奨されている浴槽水においては、現行の培養法によるレジオネラ検出基準 (検出限界以下) が妥当であることを示している。

6. 定量的診断確率の結果

臨床因子の解析結果より、曝露者の性別に異なる診断確率フローチャートを作成した (総合研究報告書に記載)。男性では、問診結果から求められる検査前診断確率が 50%を超える者を対象に尿中抗原検査を施行し、その検査後確率が 50%を超える場合に要医療と判定することが推奨される。女性では、問診後の検査前確率が 80%を超える場合には、尿中抗原検査を施行せずに (あるいは検査結果に関係なく) 要医療と判定して支障がないも

のと考えられた。

7. 臨床

天理よろず相談所病院での市中肺炎（合計 92 例）の原因微生物の頻度を検討した。うち、男性 62 例、女性 30 例、平均年齢 67.2 歳（16-87 歳）、外来治療 29 例、入院治療 61 例、外来治療から入院治療へ移行 2 例であった。米国感染症学会（IDSA）ガイドラインにおける重症度の検討では、軽症例（重症度分類 I,II）31 例、中等症例（同 III）30 例、重症例（同 IV,V）31 例であった。

原因微生物（混合感染を含む）とその頻度は、*S.pneumoniae* 26 例（28.3%）、*H.influenzae* 16 例（17.4%）、*C.pneumoniae* 9 例（9.8%）、*M.pneumoniae* 2 例（2.2%）、*Ps.aeruginosa* 2 例（2.2%）、*M.catarrhalis* 2 例（2.2%）、*C.psittaci* 2 例（2.2%）、*L.pneumophila* SG1 1 例（1%）、*K.pneumoniae* 1 例（1%）、MSSA 1 例（1%）、*E.coli* 1 例（1%）、*A.fumigatus* 1 例（1%）であった。以上、原因が判明したのが 55 例（59.8%）うち混合感染 11 例、原因不明 37 例（40.2%）であった。

レジオネラ肺炎は 92 例中 1 例のみであった。尿中原抗原検査で迅速診断しえた重症肺炎であった。

E. 考察

1. 今回検討した RAPD-PCR 法は迅速かつ簡便であり、泳動パターン解析から分離株の類似性が速やかに判断でき、疫学的調査方法の一つとして有用であった。今後は分離菌株を増やし、遺伝子学的解析の基礎データを蓄積することによってさらに詳細な検討を行い、疫学的解析に応用されることが期待される。

2. *L. pneumophila* の対数増殖期及び対数増殖後期で有意に発現量の差異が認められる蛋白質スポット合計 104 個を検出し、そのうち 80 個について蛋白質の同定に成功した。同定した蛋白質の約 8 割が対数増殖後期にて増加しており、糖新生、ケトン体生成に関連した酵素が多く含まれていた。このことは、菌の対数増殖後期において栄養の枯渇してくる生存環境が、利用できる栄養が限られた宿主内に類似した環境であるとする、栄養が豊富な *in vitro* 培養でアミノ酸のみを代謝する *L. pneumophila* が、宿主内環境では糖や脂質を利用する可能性を示した。その他、対数増殖後期にてストレス蛋白質、鞭毛構成蛋白質、twitching motility あるいは走化性に関連する蛋白質の増加が見られた。これらの蛋白質は菌の運動性及び宿主細胞死に関連する事が考えられ、感染制御因子として機能していることが推察された。

L. pneumophila の *icmN* 遺伝子、*L. dumoffii* の *traC* 遺伝子がそれぞれ上皮細胞内への侵入に関与していることが示され、病原性の解析に新たな局面を開いた。

3. マルチプレックス蛍光ビーズアレイ法は研究用、及び診断用抗原として応用できることが、確認できたので、これをキットとして提供するための準備を進めている。

4. マウスでも雌のマクロファージは雄のマクロファージよりもレジオネラの増殖を許さないことがわかった。この機序の解明はヒトのレジオネラ感染の感受性の性差を解析するのにいいモデルになると考えられる。

5. 塩素の殺菌能は高 pH になるほど低下する。いずれの pH でも一旦減少した菌数がある後に増加する現象が認められ、この現象は「塩素消毒により菌が損傷を受け、生きているが培養できない状態に一時的に陥っている」ことに起因する。生きているが培養法で検出できない塩素損傷菌はモルモットに対する病原性を失っている。この知見は、浴槽水における現行の培養法によるレジオネラ検出基準（検出限界以下）が妥当であることを示している。塩素損傷菌は培養可能状態に回復するので、塩素濃度を継続的に維持する必要がある。

6. 本研究で考案した診断フローチャートは、レジオネラ感染症の診断確率に基づき曝露者への医療対応の方針決定に客観的示唆を与える。研究結果は過去の事例の解析に基づくものであるため、今後、同様のレジオネラ集団曝露事故が発生した際に、その有用性についての検証が成されることが必要である。臨床疫学的診断法は、その基本データの正確性が保障される限り極めて簡易で実用的な診断ツールと成りえる。集団感染事例のみでなく、多様な疾患の診断法としてその概念が普及することが望まれる。

7. 本邦におけるレジオネラ肺炎の臨床について検討した。診断や治療の方法はここ数年で進歩したが、本邦でのレジオネラ肺炎の実像をさらに明らかにするために、今後も検討を重ねることが重要と考えられた。

E. 結論

平成 17 年度の研究も、環境中のレジオネラの生態、病原性についての新しい知見、迅速・網羅的検査法の開発、予防、診断、治療に関する知見が得られ、循環濾過式浴槽や水冷式空調冷却塔などを感染源とする生活環境におけるレジオネラ感染を予防するために基礎、応用の両面から寄与できた。

G. 研究発表

1. 論文発表

吉田 真一

1. Piao ZY, Sze CC, Barysheva O, Iida K, Yoshida S. Temperature-regulated Formation of Mycelial Mat-like Biofilm by *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 72(2):1613-1622, 2006
2. Iida K, Seki M, Saito M, Kawamura Y, Kajiwara H, Yoshida S. Capsule of *Streptococcus pyogenes* is Essential for Delayed Death of Mice in A Model of Streptococcal Toxic Shock Syndrome. *Microbiology and Immunology* 50(2):127-130, 2006
3. Iida K, Ueda Y, Kawamura Y, Ezaki T, Takade A, Yoshida S, Amako K. *Paenibacillus motobuensis* sp. nov., isolated from a composting machine utilizing soil of Motobu-town, Okinawa, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1811-1816. 2005
4. Kikuchi T, Mizunoe Y, Takade A, Naito S, Yoshida S. Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. *Microbiology and Immunology* 49:875-884. 2005
5. Dutta S, Kawamura Y, Ezaki T, Nair GB, Iida K, Yoshida S. Alteration in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in Quinolone-resistant *Shigella dysenteriae* serotype 1 clinical isolates from Kolkata, India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:1660-1661. 2005

古畑 勝則

- 1) 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.*, 10 : 117-120 (2005)
- 2) 斎藤優子, 小澤一弘, 小林崇良, 久保亮一, 古畑勝則 : 安全性を配慮したレジオネラ属菌検査用 GVPN 培地の性能. *用水と廃水*, 47 : 716-720 (2005)
- 3) 古畑勝則 : レジオネラ症感染防止対策に関する研究 (研究奨励賞受賞論文). *防菌防黴誌*, 33 : 397~406 (2005)
- 4) 古畑勝則 : 温泉水におけるレジオネラ汚染とその対応. *水環境学会誌*, 28 : 559-563 (2005)

宮本比呂志

1. 宮本比呂志, 吉田真一 : レジオネラ症 Update 菌側からみた新しい展開 -レジオネラのゲノム解読からみえてきたもの- *臨床と微生物* 32 (7) 6-12 2005年7月
2. 宮本比呂志 : レジオネラ 微生物感染学 (光山正雄編) 169-177 南山堂 2005年11月
3. 宮本比呂志 : レジオネラはどうやってヒトの細胞の中で生き延びるのか 最新医学 61 (2) 印刷中 2006年2月

三宅 正紀

1. Miyake M., Watanabe T., Koike H., Molmeret M., Imai Y., Abu Kwaik Y. Characterization of *Legionella pneumophila* *pmiA*, an gene essential for infectivity of protozoa and macrophages. (2005) *Infect. Immun.* 73: 6772-6282.
2. Miyake M., Fukui F., Imai Y. Differences in protein synthesis between wild type and intracellular growth-deficient strains of *Legionella pneumophila* in U937 and *Acanthamoeba polyphaga*. (2006)

Microb. Pathog. (in press)

江崎孝行

1. Amano M, Ohkusu K, Kusaba K, Ikeda H, Nagasawa Z, Aoki Y, Kawamura Y, Kobatake S, Tanaka T, Matsuura S, and Ezaki T. Quantitative microarray-based DNA-DNA hybridization assay for measuring genetic distances among bacterial species and its application to the identification of family *Enterobacteriaceae*. Microbiol. Immuno. 49(3):255-263, 2005

2. 学会発表

1) 古畑勝則：レジオネラ症感染防止対策に関する研究（研究奨励賞受賞講演）. 日本防 菌防黴学会第 32 回年次大会（2005.5）大阪.

1.三宅正紀、原田俊彦、今井康之：レジオネラのマクロファージ感染初期における NADPH オキシダーゼ産生活性酸素 種による殺菌からの回避について。第 125 回日本薬学会総会（東京）、要旨集 3 p.87、平成 17 年 3 月 30 日

2.三宅正紀、原田俊彦、今井康之：レジオネラ感染による食細胞 NADPHオキシダーゼ産生活性酸素種の産生抑制。第78回日本細菌学会総会（東京）、抄録 p.100、平成17年4月4, 5日

3.菅谷則子、今井康之、三宅正紀：リピドラフトを介した *Legionella pneumophila* のマクロファージ感染について。第78回日本細菌学会総会（東京）、抄録 p.102、平成17年4月4日

4.小池仁美、今井康之、三宅正紀：*Legionella pneumophila*新規細胞内増殖制御因子PmiAの機能解析。第78回日本細菌学会総会（東京）、抄録 p.102、平成17年4月4, 5日

5.Masaki Miyake, Takuro Watanabe, Hitomi Koike, Maëlle Molmeret, Yasuyuki Imai, Yousef Abu Kwaik. : Identification and characterization of *Legionella pneumophila pmiA*, a locus involved in infectivity of protozoa and macrophages.6th International Conference of Legionella (Chicago) Program and Abstracts Book p.28, October 17, 2005

6.三宅正紀、今井康之：*Legionella pneumophila*新規細胞内増殖制御因子の同定及び機能解析。中部乳酸菌研究会（甲府）平成17年11月25日

1. 宮本比呂志：土壌より分離された *Legionella* 属の新菌種と思われる 4 菌株について
第 78 回日本細菌学会総会 平成 17 年 4 月 東京

2. 宮本比呂志：中央循環式の給湯設備のレジオネラ汚染とその除菌
日本防菌防黴学会 第 32 回年次大会 平成 17 年 5 月 大阪

3. 宮本比呂志：特別セミナー「レジオネラの病原性発現機構」
Bacterial Adherence & Biofilm 第 19 回学術集会 平成 17 年 7 月 北九州

1) 馬庭 厚, 田口善夫, 富岡洋海, 岩崎博信, 石原亨介, 富井啓介, 梅田文一, 黄 文禧, 網谷良一, 福井基成, 石田 直, 伊藤 穰, 伊藤功朗, 三嶋理晃, 吉田真一 関西地区のレジオネラ肺炎の臨床的検討 第 75 回日本感染症学会西日本地方会総会 2005.11.17 長崎

2) 馬庭 厚, 田中栄作, 井上哲郎, 櫻本 稔, 水口正義, 前田勇司, 谷澤公伸, 竹田知史, 岡元昌樹, 小松 方, 田口善夫, 吉田真一
当院における市中肺炎の起炎菌の検討 第 66 回日本呼吸器学会近畿地方会 2005.12.10 大阪

3. 特許取得 3 件準備中

4. 実用新案登録 該当なし

II. 分担研究報告書

1. 環境中のレジオネラ汚染実態の調査・研究

古畑勝則

2. アルカリ領域における塩素の *Legionella pneumophila* に対する 消毒効果と塩素損傷レジオネラの病原性に関する研究

宮本比呂志

3. レジオネラ新規病原因子の探索研究

三宅正紀

4. レジオネラに対する抗体計測法の作成に関する研究

江崎孝行

5. レジオネラ肺炎診療の現状に関する研究

ーレジオネラ肺炎診療の現状と今後の課題について

田口善夫

6. 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

ー特に集団感染事例を対象とした解析ー

青木洋介

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

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

研究要旨

Legionella pneumophila に関する分子疫学的研究の一環として、温泉水から分離した *L.pneumophila* 1 群株について RAPD-PCR 法を用いて UPGMA クラスタ解析を行ったところ、以下の成績が得られた。

1) *L.pneumophila* 1 群 40 株について DNA 抽出を行い、RAPD-PCR 法を用いて泳動パターンの解析を行ったところ、300-6,000bp の間に約 4-17 本のバンドが認められた。その内訳は、4,000-6,000bp の間に 2 本のバンドが認められたものが 21 株(52.5%)、3,000-4,000bp の間に 2 本のバンドが認められたものが 18 株(45%)、2,000-3,000bp の間に 2 本のバンドが認められたものが 14 株(35%)および 1,550-2,000bp の間に 3 本のバンドが認められたものが 28 株(70%)であった。

2) 供試菌株の泳動パターン像をもとに UPGMA クラスタ解析を行い、類似度 90%以上で類別を行ったところ 18 群に分けられた。その中で、類似度が最も高かったのは菌株 No.26 と No.28 の 98.0%、次に菌株 No.15 と No.17 の 97.8%であった。

以上のことから、供試した *L.pneumophila* 1 群は、300~6,000bp の間にバンドが認められ、PFGE 法に比べてバンド数が少なく、RAPD-PCR 法は本菌の分子疫学的解析には有用であることが示された。

A. 研究目的

Legionella 属菌は自然環境下の土壌や湖沼などに広く生息している。一方で人工環境下のビルの冷却塔水、温泉浴槽、24 時間風呂等の家庭用循環式浴槽および噴水などの修景用水からも分離されている。また、*L.pneumophila* は呼吸器系の病原細菌であり、レジオネラ肺炎やポンティアック熱を起こすことが報告されている。

近年、温泉水においてレジオネラ属菌による感染症が注目されており、1999 年には感染症新法において新興感染症の起炎菌として四類感染症に指定された。それ以降 2002 年 12 月末までに 465 例のレジオネラ症患者が報告されている。2002 年 7 月には宮崎県の温泉施設において本邦では最大規模の 295 名が発症し、7 名が死亡する集団感染例があった。本事例では温泉ブームを背景に大きな社会問題に発展し、感染源対策が急務とされている。

本菌の疫学的調査は、主に血清学的手法によって行われてきたが、最近、Random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) 法などの遺伝子学的手法が注目されている。そこで、温泉水から分離した *L.pneumophila* 1 群 40 株について RAPD-PCR 法を用いて遺伝子学的解析を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株

供試菌株は 2003 年から 2004 年にかけて全国各地の温泉水から分離した *L.pneumophila* 血清群 1 群 40 株を用いた。

2. RAPD-PCR 法による遺伝子学的検討

RAPD-PCR 法は、Bansal らの方法に準拠して以下の方法で行った。

1)DNA の抽出:供試菌を BCYE α 寒天培地に塗抹し、37°C72 時間培養後、平板上の菌苔をかき取り、滅菌 DW1ml に入れ、懸濁液が McFarland No.0.5 になるよう調整した。この懸濁液を滅菌マイクロチューブに移し、12,000rpm、10 分間遠心を行った。この操作を 3 回繰り返した後、High Pure PCR Template Preparation Kit(Roche)を用いて本菌の DNA を抽出した。

2)PCR 法:PCR 法の反応系は、DNA テンプレート 5 μ l、dNTP(TaKaRa)5 μ l、Mg free Buffer(promega)5 μ l、MgCl₂ Buffer(promega) 5 μ l、および DNAtaq(フナコシ)1 μ l を、またランダムプライマーはプライマー I(AATCGGGCTG)およびプライマー L(TGCGGACCTG)各 2.5 μ l、滅菌 DW24 μ l を加え、合計 50 μ l とし、Robocycler GRADIENT96(フナコシ)を用いた。反応条件は、95°C1 分間の前熱変性の後、熱変性、94°C 30 秒、アニーリング 36°C60 秒、伸長反応 72°C90 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返し、最終伸長反応を 72°C8 分間行った後、4°Cに保った。

3)電気泳動:泳動用のゲルは 1.2%アガロースゲル(Certified Molecular Biology Agarose(BIO-RAD))を用いた。PCR 産物の確認は、泳動用ゲルに 8 μ l の試料と 2 μ l の電気泳動用色素溶液を加えてウェルに挿入した。DNA サイズマーカーとして、Wide-RangeDNA Ladder(TaKaRa)を用いた。泳動槽は My Run(Cosmo Bio)を使い、泳動用 buffer は 0.5×TBE buffer(1.78M Tris、1.75M Boric acid、10mM EDTA)を用いた。泳動条件は、電圧 100V、2 時間泳動した。泳動終了後直ちに、エチジウムブロマイド(10 μ l/ml)を用いて 60 分間染色し、UV 照射下で観察し、写真撮影を行った。

4)RAPD-PCR パターンの解析:供試菌株の RAPD-PCR パターンをスキャナで取り込んだ後、RAPD-PCR 画像データについて解析ソフト(Phoretix 社:1DAdvanced version 5.00)により、株間のクラスター解析を行い、UPGMA 法により系統樹を作成した。

C. 研究結果

1. *L.pneumophila* 1 群の RAPD-PCR 像からの解析

供試菌株の泳動像は、分子量約 300-6,000bp の間に約 4-17 本の泳動パターンが認められた。その中で 4,000-6,000bp の間に 2 本のバンドが認められたものが 21 株(52.5%)、1 本のバンドが認められたものが 18 株(45%)、バンドが認められなかったものが 1 株(2.5%)であった。3,000~4,000bp に 3 本のバンドが認められたものが 3 株(7.5%)、2 本のバンドが認められたものが 18 株(45%)、1 本のバンドが認められたものが 12 株(30%)、バンドが認められなかったものが 7 株(17.5%)であった。2,000~3,000bp に 4 本のバンドが認められたものが 1 株(2.5%)、3 本のバンドが認められたものが 11 株(27.5%)、2 本のバンドが認められたものが 14 株(35%)、1 本のバンドが認められたものが 8 株(20%)、バン

ドが認められなかったものが6株(15%)であった。1,550~2,000bpに3本のバンドが認められたものが28株(70%)、2本のバンドが認められたものが8株(20%)、1本のバンドが認められたものが4株(10%)であった。1,400~1,550bpに3本のバンドが認められたものが2株(5%)、2本のバンドが認められたものが12株(30%)、1本のバンドが認められたものが26株(65%)であった。1,000~1,400bpに3本のバンドが認められたものが4株(10%)、2本のバンドが認められたものが12株(30%)、1本のバンドが認められたものが10株(25%)、バンドが認められなかったものが14株(35%)であった。750~1,000bpに3本のバンドが認められたものが1株(2.5%)、2本のバンドが認められたものが10株(25%)、1本のバンドが認められたものが14株(35%)、バンドが認められなかったものが15株(37.5%)であった。500~750bpに2本のバンドが認められたものが6株(15%)、1本のバンドが認められたものが16株(40%)、バンドが認められなかったものが18株(45%)であった。400~500bpに1本のバンドが認められたものが6株(15%)、バンドが認められなかったものが34株(85%)であった。200~300bpに1本のバンドが認められたものが1株(2.5%)、バンドが認められなかったものが39株(97.5%)であった。

2. 供試菌株のRAPD-PCR像のUPGMAクラスター解析

供試菌株のRAPD-PCR像をもとにUPGMAクラスター解析を行ったところ、類似度90%以上で18群に類別された。その中で、菌株No.26とNo.28の類似度が98.0%と最も高く、次に菌株No.15とNo.17が97.8%の値を示した。また、類似度が最も低い値は68.5%であった。地域別では、鹿児島県の菌株No.41とNo.42の類似度が95.4%、栃木県の菌株No.7とNo.8の類似度が96.5%、岐阜県の菌株No.26とNo.27の類似度が92.3%、長野県の菌株No.10とNo.21の類似度が95.3%、北海道の菌株No.1とNo.3の類似度が91.9%を示し、それぞれ地域別によって高い類似性を示した。また、類似度75%で分けると北海道グループ、関東甲信越地方と東海地方グループ、および中国地方グループの3群に類別された。

D. 考察

L.pneumophila の疫学的解析は、一般的には血清学的手法を用いて調査が行われている。しかし、現在用いられている10種類の市販抗血清による血清型別では、型別不能株も多く認められることから、疫学調査には不十分であることが考えられる。一方、近年、遺伝子学的手法であるRAPD-PCR法が本菌の分子疫学的解析に応用され、良好な成果が得られている。

そこで、上述のことを加味して*L.pneumophila* 1群についてRAPD-PCR法を行い、泳動パターンを検討したところ、分子量300~6,000bpの間に4本~17本のバンドが認められた。その泳動パターンを解析したところ、90%以上の類似度では18群に類別され、多岐にわたっていたが、類似度75%では地域ごとに3群のクラスターに分かれたことから、本菌の疫学的解析に応用できることが明らかとなった。

本法による解析はBansalらが自然環境分離株の*L.pneumophila* 1群について行っているが、200~5,000bpの間に2本から15本のバンドを認めている。今回の成績と比較すると、低分子領域のバンドでは今回は300bpまでしか認められなかった。また、高分子領域のバンドでは6,000bpまでバンドが認められ、Bansalらの報告とは異なった。

RAPD-PCR法での泳動パターンをもとにクラスター解析を行ったところ、複数のバンド

パターンが認められ、Bansal らの報告と同様に多型性のパターンを示した。しかし、*L.pneumophila* の全株に共通して特異的なバンドが 1,500bp と 4,000bp のところに認められることから、本菌の疫学的調査に RAPD-PCR 法が応用可能であることが示唆された。また、試験操作も簡単で、結果が一日で判明することから、迅速性が要求される疫学解析には有用であることが示された。さらに、類似度 75% で類別した 3 群のクラスター内では全株に共通したバンド以外に各クラスターごとに特異的なバンドが認められ、地域別によりパターンが異なることが明らかになった。一方、広く分子疫学的調査に用いられている PFGE 法は、*L.pneumophila* に対して泳動パターンがきわめて多様性を示し、操作も煩雑であることから、分子疫学的調査には不的確であることが報告されているが、今回検討した RAPD-PCR 法では、PFGE 法に比べてバンドパターンが特定な位置に認められることから、本法は有用であると考えられた。

E. 結論

以上のように、今回検討した RAPD-PCR 法は迅速かつ簡便であり、泳動パターン解析から分離株の類似性が速やかに判断でき、疫学的調査方法の一つとして有用であった。今後は分離菌株を増やし、遺伝子学的解析の基礎データを蓄積することによってさらに詳細な検討を行い、疫学的解析に応用されることが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.*, 10 : 117-120 (2005)

2) 斎藤優子, 小澤一弘, 小林崇良, 久保亮一, 古畑勝則: 安全性を配慮したレジオネラ属菌検査用 GVPN 培地の性能. *用水と廃水*, 47 : 716-720 (2005)

3) 古畑勝則: レジオネラ症感染防止対策に関する研究 (研究奨励賞受賞論文). *防菌防黴誌*, 33 : 397~406 (2005)

4) 古畑勝則: 温泉水におけるレジオネラ汚染とその対応. *水環境学会誌*, 28 : 559-563 (2005)

2. 学会発表

1) 古畑勝則: レジオネラ症感染防止対策に関する研究 (研究奨励賞受賞講演). *日本防菌防黴学会第 32 回年次大会* (2005.5) 大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

アルカリ領域における塩素の *Legionella pneumophila* に対する消毒効果と 塩素損傷レジオネラの病原性に関する研究

分担研究者 宮本 比呂志 (佐賀大学医学部・病因病態科学)

研究協力者 吉村 博子 (産業医科大学医学部・微生物学)

研究要旨

塩素の殺菌能は高 pH になるほど低下することが確認されたが、いずれの pH でも一旦減少した菌数その後増加する現象が認められた。蛍光染色法を培養法と併用することで、この現象は「塩素消毒により菌が損傷を受け、生きているが培養できない状態に一時的に陥っている」ことに起因することが判明した。また、生きているが培養できない状態の塩素損傷菌はモルモットに対する病原性を失っていることも明らかとなった。培養法で検出できない状態の塩素損傷菌が病原性を示さないという知見は、塩素消毒が推奨されている浴槽水においては現行の培養法によるレジオネラ検出基準（検出限界以下）が妥当であることを示している。また、「培養不能状態に陥った塩素損傷菌が一時的に培養能を回復する」という知見は、塩素消毒は単回施行では不十分であり、連続的に行うことで塩素濃度を継続的に維持する必要があることを示している。

研究目的

現在、浴槽水の消毒には塩素系薬剤を使用することが推奨されているが、塩素系殺菌剤の殺菌能は高 pH になるほど低下することが知られている。しかしながら、具体的な報告は少ない。また、塩素消毒により生きているが培養できない状態の損傷菌が出現することが予想されるが、これらの損傷菌が病原性をもつか否かは不明である。培養で検出できない損傷状態のレジオネラも病原性を持つならば現行の培養法によるレジオネラ検出基準を見直す必要が生じる。本年度は（1）アルカリ領域でのレジオネラ消毒効果を明らかにすること（2）塩素消毒により生きているが培養法で検出できない損傷状態に陥ったレジオネラが病原性を保持しているか否かを明らかにすることを目的に研究を行った。

研究方法

共試菌

福岡市内の温浴施設浴槽水より平成14年に分離された *Legionella pneumophila* JLP1087（血清群5）を使用した。

塩素接触試験

石間らの方法（日本防菌防黴学会第29回年次大会要旨集 p74、平成14年）を改変して行った。す

なわち、BCYE 培地で3日間前培養した菌株を、pH 8.0 から pH 10.0 に調整した 3mM リン酸緩衝液に約 5×10^6 CFU/mL になるよう懸濁した。別途、各 pH のリン酸緩衝液に次亜塩素酸ナトリウムを適宜添加して遊離塩素濃度が約 1.0 ppm の塩素溶液を作成し、同一の pH の菌懸濁液と塩素溶液を等量混合してレジオネラと塩素を接触させた（このとき、試験液の塩素濃度は約 0.5 ppm）。pH 9.2 と 10.0 での実験では遊離塩素濃度が約 2.0 と 4.0 ppm の塩素溶液も作成して接触試験を行った（このときは、試験液の塩素濃度はそれぞれ約 1.0 と 2.0 ppm）。これらの試験液は 40°C で 31 分まで静置した。塩素接触静置中、2 分または 5 分間隔で 0.01M（終濃度）のチオ硫酸ナトリウム液を添加してレジオネラと塩素の接触を停止し、試験液を適宜希釈して BCYE 培地に塗布し、37°C で培養した。実験はトリPLICATEで最低 2 回行い、再現性を確認した。結果はそのうちの 1 回のデータを平均値±標準偏差で示した。

なお、接触試験終了時における遊離塩素濃度の減衰はいずれの場合も開始時の 10% 未満であった。

2 重蛍光染色法による菌数計測

チオ硫酸ナトリウム液で塩素との接触を停止した液 0.5 mL をフィルター（ヌクレオポア 0.2mm 孔径）をセットしたろ過器で吸引ろ過した。その後、3 mL の蛍光染色用バッファー（0.1M リン酸緩衝液 pH 8.5, 5% NaCl, 0.5mM EDTA-2Na）をろ過後のフィルターに重層添加した。まず、CFDA アセトン溶液（終濃度 150mg/ml）を加え、2 分間静置し染色した。その後、エチジウムブロマイド水溶液（終濃度 100 mg/L）を加え、10 分間室温で染色した。両者で染色した後、これらの染色液を吸引ろ過し、滅菌水でフィルターを一度洗浄した後、フィルターをろ過器より無蛍光スライドグラス上に取り出した。無蛍光オイルでカバーグラス間にフィルターを封入したのち落射型蛍光顕微鏡で菌数を計測した。1 試料につき 20 視野をカウントし 1mL あたりの菌数を算出した。エチジウムブロマイド陽性菌数、CFDA 陽性菌数をそれぞれ、全菌数、生菌数と判定した。

塩素損傷菌のモルモット感染実験

pH 9.0, 遊離塩素濃度 0.7 ppm の条件で塩素に 17 分間接触させたレジオネラ菌液（生菌数は 7.4×10^4 cells/mL で培養可能菌数は 10 CFU/mL 未満）を 3 匹のモルモットの腹腔内に 5 mL ずつ注射し、発熱の有無を一週間観察した。

（倫理面への配慮）

本実験は産業医科大学動物実験および飼育倫理委員会の承認を受けた（承認番号：AE99-014）。

研究結果と考察

（培養法による塩素接触試験）

pH 8.1, 遊離残留塩素濃度 0.47ppm では 11 分で菌は検出限界以下（10CFU/mL 未満）に殺菌

された。しかし、5分から7分にかけてCFUは約10倍に増えた(図1)。

pH8.5、遊離残留塩素濃度0.58 ppmでは13分で菌は検出限界以下(10 CFU/mL未満)に消毒された。7分から9分にかけて約5倍のCFUの増加が観察された(図2)。

pH9.2、遊離残留塩素濃度0.58 ppmでは11分でも約 10^3 CFU/mLの菌が生残しており(図3)、pH8.1や8.5の場合に比べ消毒能の低下が示唆された。しかし、塩素濃度を0.99 ppmに保てば11分で検出限界以下に消毒された(図4)。

pH10.0、遊離残留塩素濃度0.46 ppmでは検出限界以下に消毒するためには31分を必要とし、15分から19分~25分にかけて約10倍のCFUの増加が認められた(図5)。塩素濃度を1.04 ppmに保った場合は27分で検出限界以下に消毒されが(図6)、塩素濃度を約2倍の1.92 ppmにあげても15分で約 10^3 CFU/mLの菌が生残した。9分から13分にかけて約20倍のCFUの増加も観察された(図7)。

高pHでは塩素が効きにくいことが培養法で確認されたが、塩素接触時間が長くなるほど減少すると予測されたCFUが、一時的に増加する現象が観察された。このことは塩素消毒によりレジオネラが生きているが培養できない損傷菌に陥ることを示唆している。

(蛍光染色法を培養法と併用した場合の塩素接触試験)

上記の考察を確かめるため、pH9.0 遊離残留塩素濃度0.7 ppmの条件で接触試験を行い、全菌数(生菌数+死菌数)、生菌数、培養可能菌数を測定した。

図8に示したように15分から19分にかけて菌は一時的に培養できない状態に陥るが、 10^4 cells/mL程度の菌が生残しており、21分から29分にかけて一部の菌が培養可能な状態に回復することが明らかとなった。しかし、31分後にはすべてが死菌になり、集落形成能も失った。

この結果はレジオネラが塩素消毒により培養法で検出されないが生きている損傷菌に陥ることを示している。また、培養法で不検出という検査結果から、塩素消毒を中断すると、このような損傷菌が培養可能に回復する可能性があることを示唆している。

(塩素損傷菌を使用したモルモット感染実験)

発熱の有無を一週間観察したが、いずれのモルモットも発熱しなかった。

培地での増殖能を失った損傷菌は生菌であるが、病原性を失っていることが示唆された。塩素消毒が推奨されている浴槽水においては、現行の培養法によるレジオネラ検出基準(検出限界以下)が妥当であることを示している。

結論

塩素の殺菌能は高 pH になるほど低下する。

いずれの pH でも一旦減少した菌数が増加する現象が認められ、この現象は「塩素消毒により菌が損傷を受け、生きているが培養できない状態に一時的に陥っている」ことに起因する。

生きているが培養法で検出できない塩素損傷菌はモルモットに対する病原性を失っている。この知見は、浴槽水における現行の培養法によるレジオネラ検出基準（検出限界以下）が妥当であることを示している。

塩素損傷菌は培養可能状態に回復するので、塩素濃度を継続的に維持する必要がある。

健康危険情報

該当無し

研究発表

1. 論文発表

レジオネラ症 Update 菌側からみた新しい展開 -レジオネラのゲノム解読からみえてきたもの-
臨床と微生物 32 (7) 6-12 2005 年 7 月

レジオネラ 微生物感染学 (光山正雄編) 169-177 南山堂 2005 年 11 月

レジオネラはどうやってヒトの細胞の中で生き延びるのか 最新医学 61 (2) 印刷中 2006 年 2 月

2. 学会発表

土壌より分離された *Legionella* 属の新菌種と思われる 4 菌株について
第 78 回日本細菌学会総会 平成 17 年 4 月 東京

中央循環式の給湯設備のレジオネラ汚染とその除菌
日本防菌防黴学会 第 32 回年次大会 平成 17 年 5 月 大阪

特別セミナー「レジオネラの病原性発現機構」

Bacterial Adherence & Biofilm 第 19 回学術集会 平成 17 年 7 月 北九州

知的財産権の出願・登録状況

該当無し