

されている<sup>3)</sup>。2002年7月には宮崎県で循環式温泉入浴施設の浴槽水を感染源とした集団感染が発生し、本邦では最大規模の事例となった<sup>3)</sup>。

*Legionella* 属菌が土壌などの自然環境下に広く生息していることは周知の事実である<sup>4)</sup>。一方で、ビルの冷却塔水や家庭用24時間風呂等の循環式浴槽水あるいは温泉浴槽水など人工環境下からも高頻度に分離されている<sup>5)</sup>。

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いるのが実情である。しかし近年、分子疫学的な手法の一つであるパルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis: PFGE) を用いて DNA 断片の泳動パターンを解析することが菌株間の類似性を知るために有用であることが報告されている<sup>6)</sup>。

そこで、*L. pneumophila* の疫学的な基礎的検討として、東京都内で分離された *L. pneumophila* 1群の臨床由来株と環境由来株について、PFGEにより株間の類似性について検討を行った。

## 材料および方法

### 1. 供試菌株

供試菌株は Table 1 に示すとおり、都内で分離された臨床および環境由来の *L. pneumophila* 血清群 1 群39株を用いた。その内訳は臨床分離株 3 株 (CL1~CL3)、冷却塔水分離株 25 株 (CT1~CT25)、浴槽水分離株 7 株 (BW1~BW7)、土壌分離株 3 株 (SL1~SL3) および水景用水分離株 1 株 (DW1) である。

### 2. PFGE

PFGE は Schwartz らの方法<sup>7)</sup> に準拠して以下のとおり行った。

Table 1. Tested strains of *L. pneumophila* serogroup 1.

origin (sign)	number of tested strains
clinical materials (CL)	3
cooling tower water (CT)	25
whirlpool bath water (BW)	7
soils (SL)	3
decorative water (DW)	1
total	39

1) アガロースブロックの調製：供試菌を BCYE  $\alpha$  寒天培地 (栄研化学) に塗抹して 37°C 72 時間培養後、平板上の菌苔を 1  $\mu$ l ディスパーザブルループで 1/2 量かき取って PettIV 溶液 (1M Tris-HCl, 1M NaCl) 1 ml に浮遊させ、McFarland No.0.5 になるように調整した。菌体を洗浄してから PettIV 溶液 1 ml に再懸濁し、2% インサートアガロース (BMA) と等量ずつ混和後、インサートモルド (Bio-Rad) に 100  $\mu$ l ずつ分注した。これを -20°C で 5 分間冷却し、さらに 4°C で 1 時間放置して固形化した。このアガロースブロック 1 個につき EC Lysis {6 mM Tris-HCl (pH7.6), 1M NaCl, 0.5M EDTA, 0.2% Deoxycholic acid (Sigma), 0.5% N-Lauroylsarcosine (Sigma), 0.5% Polyoxyethylen(20)cetyl ether (Sigma)} 500  $\mu$ l と 100mg/ml Lysozyme (Amersham Pharmacia Biotech Inc) 5  $\mu$ l および 2 mg/ml Rnase {Ribonuclease A (Sigma)} 1  $\mu$ l をそれぞれマイクロチューブに入れて 37°C, 4 時間インキュベートし、溶菌を行った。その後、ESP {1 mg/ml Protinase K (Life technologies), 0.5M EDTA (pH9.0), 1% N-Lauroylsarcosine (Sigma)} 500  $\mu$ l に 1 ブロックを入れ、50°C 16~24 時間インキュベートして徐タンパクを行った。反応後、Proteinase K を失活させるため、TE buffer {10mM Tris-HCl (pH7.4)} 1 ml と PMSF {0.1mol/ml Phenylmethylsulfonyl Fluoride (Wako), Isopropanol (Wako)} 13  $\mu$ l を加えた溶液に 1 ブロック入れ、常温で 2 時間振盪した。その後、新たな TE buffer と PMSF に交換して 6 時間静置した。さらに、15 分おきに TE buffer を 6 回入れ替えてブロックの洗浄を行った後、4°C で保存した。

2) 制限酵素による DNA の消化：DNA の消化には制限酵素 *Sfi* I (Toyobo) を用いた。反応液は、10  $\times$  M buffer 20  $\mu$ l, 2  $\times$  ME {2-Mercaptoethanol (Sigma)} 14  $\mu$ l, DW 114.8  $\mu$ l と添付の M buffer に添加した *Sfi* I 12.5U をそれぞれマイクロチューブに入れて調整した。これに 1/2 量アガロースブロックを入れ、50°C で 16

～20時間インキュベートして消化後、電気泳動を行った。

3) 電気泳動：ゲルは1%アガロースゲル {Certifide Molecular Biology Agarose (Bio-Rad)}を用いた。DNA消化を行ったアガロースブロックの1/3量を泳動用ゲルのウェルに挿入した。また、サイズマーカーとして、Lambda DNA ladders (BMA)を用いた。

泳動槽はCROSSFIELD (ATTO)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、Buffer温度14°C, 電圧180V, パルスタイムは45秒, 泳動時間20時間とした。泳動終了後、直ちにエチジウムブロマイド (0.5 μl/ml)を用いて15分間染色し、その後蒸留水で15分間脱色してからUV照射下で写真撮影を行った。

### 3. PFGE パターンの解析

供試菌株のゲノムDNA制限酵素切断パターンをスキャナで取り込んだ後、解析ソフト (Phoretix社: 1D Advanced version 5.00)により、株間のクラスター解析を行い、UPGMA

法 (Unweight pair group method using arithmetic averages, 平均距離法)により系統樹を作成した。

## 結 果

### 1. *L. pneumophila* 1群のPFGE像

供試菌株の泳動像はFig.1に示すとおり、分子量約50～850kbp (kilobase pair; 1 kbpは1,000塩基対に等しい核酸の長さの単位)の間に5本から15本のバンドが識別され、多様な泳動パターンが認められた。その中で450～500kbpの間に2本のバンドが認められたものが28株 (72%)あった。その由来別では、冷却塔水由来が23株 (92%), 浴槽水由来が3株 (42.9%), 土壌由来と臨床由来がそれぞれ1株 (33.3%)であった。350kbpに1本のバンドが認められたものは21株 (53.8%)あった。その由来別では、冷却塔水由来が17株 (68%), 浴槽水由来が3株 (42.9%), 土壌由来が1株 (33.3%)であった。600kbpに1本のバンドが認められたものは21株 (53.8%)あった。その由来別では、冷却塔水由来が16株 (64%), 浴槽水由来が4株 (57.1%),

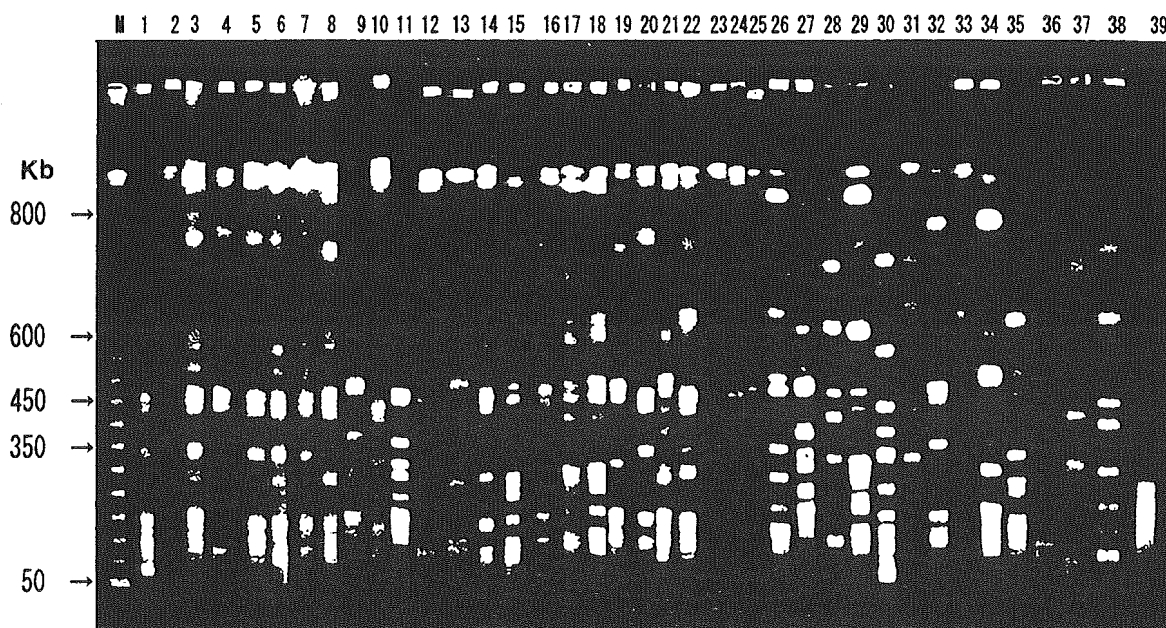


Fig.1. PFGE patterns of *L. pneumophila* serogroup 1 isolates from patients or environmental samples in Tokyo.

Lane M, Lambda Ladder DNA standard; lanes 1-25, cooling tower water-derived strains; lanes 26-32, bath water-derived strains; lanes 33-35, soil-derived strains; lanes 36-38, clinical strains; lane 39, decorative water-derived strain.

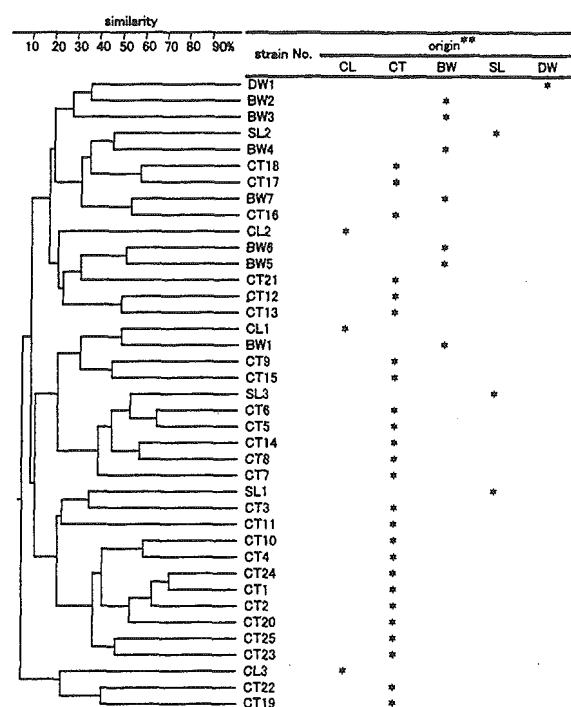


Fig.2. The dendrogram of the PFGE profiles of *L. pneumophila* serogroup 1 isolates from patients or environmental samples in Tokyo.

\*\* CL, clinical strains; CT, cooling tower water-derived strains; BW, bath water-derived strains; SL, soil-derived strains; DW, the decorative water-derived strain.

土壌由来が1株 (33.3%) であった。350kbp, 450~500kbp および600kbp にバンドが認められたものが14株 (35.9%) があった。その由来別では、冷却塔水由来が12株 (48%), 浴槽水由来が2株 (28.6%) であった。300kbpにバンドが認められた14株 (56%) と750kbpにバンドが認められた12株 (48%) はすべて冷却塔水由来であった。850kbp にバンドが認められた4株 (57%) は浴槽水由来であった。

## 2. PFGE 像のクラスター解析

供試菌株の PFGE 像をもとに系統樹を作成し, UPGMA クラスター解析を行った。Fig.2 に示すように, 冷却塔水由来である CT1 と CT24 が類似度73% と最も高く, 次に CT5 と CT6 が67%, CT2 と CT1, CT24 がそれぞれ64% を示したが, 他の菌株の類似度はさらに低かった。由来別では, 冷却塔水由来25株中14株 (56%) と浴槽水由来7株中2株 (29%) は同じ由来間での類似度が50

% ≤ であった。臨床由来と土壌由来では類似度が20% > であった。異なる由来間の比較においては, CT16 と BW7 では55%, CT5, CT6 および SL3 では53%, BW1 と CL1 では50% の類似度を示したに過ぎなかった。また, 浴槽水由来株は同一群に分布する傾向が認められたが, 冷却塔水由来株は全体的に分布した。

## 考 察

*L. pneumophila* の疫学的解析は, 血清学的手法を用いて調査するのが一般的である。しかし, 集団感染が発生した際には, 患者由来株と環境由来株との同一性を明らかにすることが重要であるため, 菌株間の差を詳細に識別できる PFGE 法の方が血清学的手法より優れた方法であるといわれる<sup>6)</sup>。最近, 河野らが臨床由来株と温泉水由来株について PFGE 法を用いて分子疫学的解析を行い, 感染源を特定している<sup>3)</sup>。

今回, 著者らは都内で分離された *L. pneumophila* 1 群の臨床および環境由来株について *Sfi* I で酵素処理を行い, PFGE 法により泳動パターンの類似性を検討した。その結果, 分子量およそ50~850kbp の間に5本から15本のバンドが認められた。Schoonmaker らが行った成績では<sup>8)</sup>, 50~700kbp の範囲に10本から15本のバンドを認めており, 低分子領域のバンドでは今回の成績と一致したが, 高分子領域のバンドでは今回の方が850kbp までバンドが認められた。

PFGE での泳動パターンから制限酵素断片長多型性解析 (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP) とクラスター解析を行ったところ, 臨床由来, 冷却塔水由来, 浴槽水由来, 土壌由来および水景用水由来との間には, 明確な同一パターンは認められず, 非常に多様な泳動パターンを示すことが明らかになった。冷却塔水由来株の RFLP では, 450~500kbp の間に2本のバンドが認められたものが23株 (92%), 350kbp に1本のバンドが認められたものが17株 (68%), 600kbp に1本のバンドが認められたものが16株 (64%), 350kbp, 450~500kbp および600kbp にバンドが認められたものが12株 (48

%)あった。これらにより冷却塔水由来では、分離場所が異なっても350kbp, 450~500kbpの間と600kbpの位置にバンドが認められる傾向が高いと考えられた。クラスター解析において、冷却塔水由来ではCT1とCT24が類似度73%と最も高く、次にCT5とCT6が67%, CT2とCT1, CT24が64%であり、25株中14株(56%)は類似度が50%以下を示し、比較的類似性が高いと考えられた。また、浴槽水由来株は850kbpの位置にバンドが現れる株が多く認められることが明らかになった。しかし、臨床由来株と土壌由来株では、特定した位置にバンドは認められなかった。

PFGEによる泳動パターンについて、渡辺らは*L. pneumophila* 1群の臨床分離株31株および環境分離株18株の計49株についてRFLP解析を行い、泳動パターンがきわめて多様性に富むこと、臨床分離株と環境分離株が区別できるような特異的なDNAパターンは認められなかったことを報告している<sup>9)</sup>。

一方、木内らの報告<sup>10)</sup>では、冷却塔水と浴槽水からそれぞれ分離した*L. pneumophila* 1群の泳動パターンの比較を行い、同一の採取場所から分離した菌株は同一パターンを示したが、血清群が同じでも採取場所が異なると泳動パターンは一致しなかった。これらのことから、今回供試した菌株は分離された場所がすべて異なるため、木内らが指摘しているように、泳動パターンが多様化していることが考えられた。

## 結 語

以上のように、同一血清群の*L. pneumophila*であってもPFGE泳動パターンは多岐に渡ることが判明した。こうしたなかで泳動パターンが一致することは両菌株が同一由来で、しかも同時期に生息していたことを強く示唆するものであり、疫学的調査には重要な情報になるものと考えられた。

本研究は平成15年度厚生労働科学研究費補助

金(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) Fraser, D.W., *et al.* (1977) Legionnaires' disease description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, **297**, 1189-1196.
- 2) Glick, T.H., *et al.* (1978) Pontiac fever an epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiological aspects. *Am. J. Epidemiol.*, **107**, 149-160.
- 3) 国立感染症研究所 (2003) レジオネラ症. 病原微生物検出情報, **24**, 27-36.
- 4) 古畑勝則, 他 (2002) 土壌からのレジオネラ属菌の分離状況. 防菌防黴, **30**, 555-561.
- 5) 古畑勝則 (1998) 水環境におけるレジオネラ属菌の汚染と制御. 日食微誌, **15**, 1-9.
- 6) Riffard, S., *et al.* (1998) Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 161-167.
- 7) Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, **37**, 67-75.
- 8) Schoonmaker, D., Heimberger, T. and Birkhead, G. (1992) Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1491-1498.
- 9) 渡辺治雄, 前川純子, 倉 文明 (1997) レジオネラ感染症の分子疫学的手法の開発に関する研究. 平成9年度厚生省新興再興感染症研究事業, 1-5.
- 10) 木内 雄, 他 (1997) 秋田県内で分離された *Legionella pneumophila* SG1 の PFGE による解析. 秋田県衛生科学研究所報, **41**, 27-30.

【報文】

## 温泉水由来 *Legionella pneumophila* の 薬剤感受性

古畑 勝則<sup>1\*</sup>, 原 元宣<sup>2</sup>,  
福山 正文<sup>1</sup>, 吉田 真一<sup>3</sup>

### Antibiotic Sensitivity of *Legionella pneumophila* Strains Isolated from Hot Spring Bath Waters in Japan

Katsunori FURUHATA<sup>1\*</sup>, Motonobu HARA<sup>2</sup>,  
Masafumi FUKUYAMA and Shin-ichi YOSHIDA

<sup>1</sup>College of Environmental Health, Azabu University  
1-17-71, Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan

<sup>2</sup>School of Veterinary Medicine, Azabu University  
1-17-71, Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan

<sup>3</sup>Faculty of Medical Sciences, Kyushu University  
3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8582, Japan

As a part of an epidemiological study of Legionellosis, 124 strains of *Legionella pneumophila* isolated from hot spring bath waters nationwide in 2003 were subjected to the drug sensitivity test with 10 drugs using the Etest. The MIC<sub>90</sub> of an antituberculous agent, rifampicin, was 0.125 μg/ml, showing the strongest antimicrobial activity among the test drugs. Levofloxacin and imipenem showed antimicrobial activity with the MIC<sub>90</sub> of 0.5 μg/ml, azithromycin and sparfloxacin with the MIC<sub>90</sub> of 1 μg/ml, and erythromycin, clarithromycin, and gentamicin with the MIC<sub>90</sub> of 2 μg/ml. In contrast, the MIC<sub>90</sub> values of minocycline and piperacillin were 16 μg/ml and >256 μg/ml, respectively. The drug sensitivity of the isolates from hot spring bath water was slightly lower than those of clinical and soil isolates.

(Accepted 16 February 2004)

**Key words** : *Legionella pneumophila* (レジオネラ ニューモフィラ)/Antibiotic sensitivity (薬剤感受性)/Hot spring bath water (温泉浴槽水).

### 緒 言

*Legionella pneumophila* が全国各地の土壌に広く生息していることはすでに報告した<sup>1)</sup>。これらが空調用冷却塔や温泉浴槽などに侵入し、ここで増殖した本菌がエアロゾルとともに飛散することによりヒトに感染し、肺炎などの呼吸器系疾患

を起こすものと推察される。

近年、入浴施設におけるレジオネラ属菌の集団感染が相次ぐなか、2002年7月には宮崎県で循環式温泉入浴施設の浴槽水を感染源としたレジオネラ症が発生し、本邦では最大規模の事例となった<sup>2)</sup>。こうした状況を背景に温泉施設での感染源対策が急務とされている。そこで、著者らは上述

<sup>1</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 ☎042-754-7111 (内361)

<sup>2</sup>麻布大学・獣医学部 〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71 ☎042-754-7111 (内294)

<sup>3</sup>九州大学大学院・医学研究院 〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1 ☎092-642-6127

のことを踏まえ、レジオネラ属菌の生態学的研究の一環として、わが国の温泉水における本菌の生息状況を調査した。その結果、レジオネラ属菌は北は北海道から南は九州、沖縄まで全国各地の温泉水から分離された<sup>3)</sup>。

今回は、これら温泉水由来株の薬剤感受性を検討し、疫学的な基礎データを得ることを目的とした。

## 材料および方法

### 1. 供試菌株

2003年に全国各地の温泉水から分離同定した *L. pneumophila* 124株を用いた。その内訳は *L. pneumophila* 血清群1群17株、3群12株、4群13株、5群12株、6群12株、8群11株、9群11株、10群16株、11群6株、12群6株、13群5株、15群3株であった。

### 2. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験には Etest (AB BIODISK, アスカ純薬) を用いて添付の technical guide に従って行った。対象薬剤はマクロライド系抗菌薬として erythromycin (EM), clarithromycin (CAM), azithromycin (AZM), テトラサイクリン系抗菌薬として minocycline (MINO), ニューキノロン系抗菌薬として levofloxacin (LVFX), sparfloxacin (SPFX),  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬として piperacillin (PIPC),

imipenem (IPM), アミノグリコシド系抗菌薬として gentamicin (GM), および抗結核薬である rifampicin (RFP) の計10薬剤である。

BCYE  $\alpha$  寒天培地 (栄研化学) で供試菌を3日間前培養後、菌苔をかき取って滅菌生理食塩水に浮遊させ、McFarland No. 1 となるように菌液を調製した。これを BCYE  $\alpha$  寒天培地 (メルク, 直径150mm シャーレ (Greiner) に60ml ずつ分注) に0.5ml 塗抹してから Etest のストリップを培地上に密着させ、36°C で3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. 各種薬剤に対する温泉水由来 *L. pneumophila* の MIC 分布

10薬剤に対する供試菌株の MIC 分布を Table 1 に、また、その累積分布を Fig.1 に示した。MIC 分布について、EM では0.25~2  $\mu$ g/ml に分布し、ピーク (最頻値) は1  $\mu$ g/ml, CAM では0.5~2  $\mu$ g/ml に分布し、ピークは2  $\mu$ g/ml, AZM では0.125~2  $\mu$ g/ml に分布し、ピークは0.5  $\mu$ g/ml, MINO では2~32  $\mu$ g/ml に分布し、ピークは8  $\mu$ g/ml, LVFX では0.25~1  $\mu$ g/ml に分布し、ピークは0.5  $\mu$ g/ml, SPFX では0.125~1  $\mu$ g/ml に分布し、ピークは0.5  $\mu$ g/ml, GM では0.25~4  $\mu$ g/ml に分布し、ピーク

Table 1. Sensitivity of *L. pneumophila* isolated from hot spring bath waters to antimicrobial agents.

Antimicrobial agents	MIC ( $\mu$ g/ml)															Total			
	0.004	0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64		128	256	>256
Erythromycin							2	17	62	43									124
Clarithromycin								6	40	78									124
Azithromycin						2	17	68	27	10									124
Minocycline										2	19	55	46	2					124
Levofloxacin							43	75	6										124
Sparfloxacin						1	33	75	15										124
Piperacillin			2	7	6	5	10	14	3	5	2	6	17	15	7	5	2	18	124
Imipenem	1	9	25	22	16	30	7	12	2										124
Gentamicin							1	11	29	78	5								124
Rifampicin				1	9	102	11	1											124

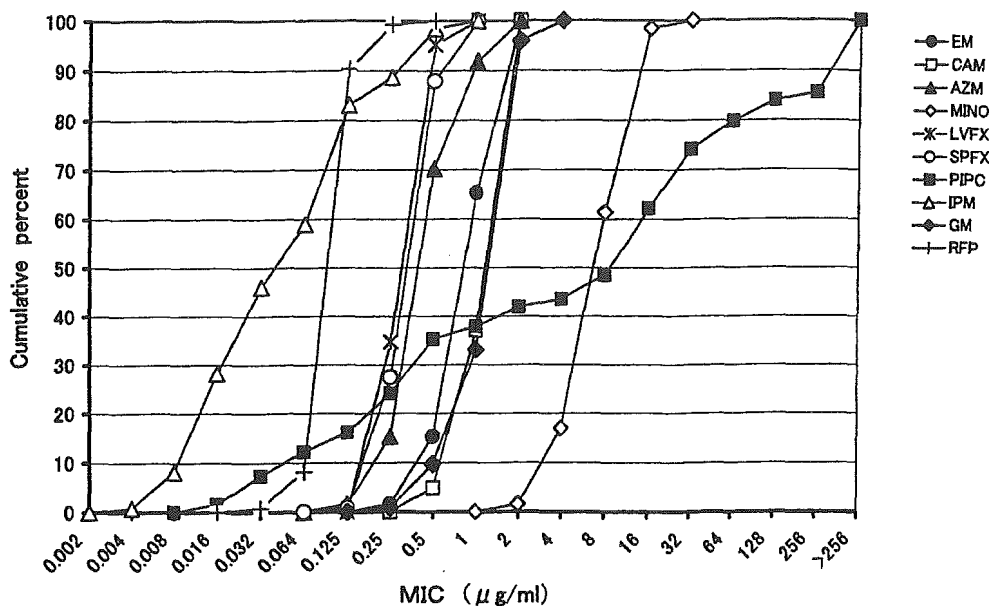


Fig.1. Cumulative distribution of MIC for *L. pneumophila* isolated from hot spring bath waters.

クは 2 μg/ml, RFP では 0.032~0.5 μg/ml に分布し、ピークは 0.125 μg/ml であった。このように、供試した 10 薬剤中 8 薬剤が 1 峰性のピークを示したが、IPM では 0.004~1 μg/ml に分布し、ピークは 0.016 μg/ml と 0.125 μg/ml に認められ、2 峰性であった。また、PIPC では 0.016~>256 μg/ml に幅広く分布し、0.5 μg/ml, 16 μg/ml および >256 μg/ml にゆるやかなピークが認められた。このうち、 $\geq 256 \mu\text{g/ml}$  の極めて感受性の低い株が 20 株 (16.1%) あった。

なお、血清群別の MIC 分布についても検討したが、いずれの血清群においても全体の分布と酷似しており、血清群別による顕著な特徴はみられなかった。

2. 各種薬剤における MIC<sub>50</sub> の比較

各薬剤における 50% MIC 値 (MIC<sub>50</sub>) と 90% MIC 値 (MIC<sub>90</sub>) を Table 2 に示した。供試薬剤ごとの MIC<sub>90</sub> を比較すると、10 薬剤のうち RFP が 0.125 μg/ml と最も優れた抗菌力を示し

Table 2. MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> and MIC ranges of 10 antimicrobial agents for *L. pneumophila* isolated from hot spring bath waters using the Etest.

Antimicrobial agents	MIC (μg/ml)		
	range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
Erythromycin	0.25 - 2	1	2
Clarithromycin	0.5 - 2	2	2
Azithromycin	0.125 - 2	0.5	1
Minocycline	2 - 32	8	16
Levofloxacin	0.25 - 1	0.5	0.5
Sparfloxacin	0.125 - 1	0.5	1
Piperacillin	0.016 - >256	16	>256
Imipenem	0.004 - 1	0.064	0.5
Gentamicin	0.25 - 4	2	2
Rifampicin	0.032 - 0.5	0.125	0.125

n=124

た。次に、LVFX と IPM が  $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、AZM と SPFX が  $1 \mu\text{g/ml}$ 、EM、CAM および GM が  $2 \mu\text{g/ml}$  であった。ところが、MINO は  $16 \mu\text{g/ml}$ 、PIPC は  $>256 \mu\text{g/ml}$  と高い値を示した。RFP に比べ、LVFX と IPM は 4 倍、AZM と SPFX は 8 倍、EM、CAM および GM は 16 倍、RFP よりそれぞれ劣っていた。さらに MINO は 128 倍、PIPC は 4,096 倍の差があった。

## 考 察

元来、土壤に生息しているレジオネラ属菌が温泉浴槽水にも侵入して増殖し、レジオネラ症の感染源となることが考えられる。著者らはレジオネラ症に関する疫学的研究の一環として、以前に全国各地の道端などの土壤から分離同定されたレジオネラ属菌の薬剤感受性を報告した<sup>4)</sup>。これら土壤由来株の薬剤感受性と温泉水由来株のそれを比べてみると、MIC 分布は類似していたものの、温泉水由来株で、低い傾向が認められた。両者の感受性を MIC<sub>90</sub> で比較すると、MINO と SPFX ではそれぞれ  $16 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$  の同値を示したが、EM、CAM、AZM、LVFX、GM、RFP ではいずれも温泉水由来株の方が 2 倍高い MIC 値を示した。さらに、IPM では 8 倍高い  $0.5 \mu\text{g/ml}$  であり、PIPC では  $>256 \mu\text{g/ml}$  で 32 倍以上の差が認められた。

また、市販園芸用土から分離同定されたレジオネラ属菌<sup>5)</sup> と温泉水由来株の MIC<sub>90</sub> を比較すると、供試した 10 薬剤のうち 7 薬剤で MIC 値が同じであったが、MINO、SPFX、IPM ではそれぞれ 2 倍ずつ園芸用土由来株の方が高い値を示した。

一方、王<sup>6)</sup> は、EM、CAM、SPFX における MIC<sub>90</sub> をそれぞれ  $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.016 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.063 \mu\text{g/ml}$  と報告しており、今回の成績より 4 倍から 16 倍、CAM では 128 倍感受性が高かった。しかし、王が供試した 50 株の内訳をみると、半数が *L. pneumophila* 以外の菌種であり、また基準株や標準株がその半数を占めていたことから、今回とは異なった成績を示したものと考えられた。

レジオネラ症は感染症の一つであるから、その治療に抗菌薬が有効であることはいままでもない。しかし、レジオネラ属菌の多くが  $\beta$ -ラクタマーゼを産生したり、細胞内増殖性を有することから、治療に使用される薬剤は MIC 値が低いだけではなく、細胞内移行性の良好なものでなければならない。そこで一般的には EM、CAM、RFP およびニューキノロン系薬剤が使用されている<sup>7)</sup>。

Edelstein と Meyer は臨床由来株を対象に薬剤感受性試験を行い、RFP の MIC が  $0.025 \mu\text{g/ml}$  から  $0.125 \mu\text{g/ml}$  に分布し、高い感受性を示したことを報告している<sup>8)</sup>。また、EM では  $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$  の MIC であった。しかし、GM の MIC は  $0.25 \mu\text{g/ml}$  から  $2 \mu\text{g/ml}$  に分布しており、感受性はやや低かった。さらに、MINO では  $1 \mu\text{g/ml}$  から  $8 \mu\text{g/ml}$  の MIC を示し、低い感受性であった。

また、Orrison らの報告<sup>9)</sup> では、環境由来株と臨床由来株の MIC 測定の結果、RFP では両者に差はなく、いずれも  $0.03 \mu\text{g/ml}$  から  $0.06 \mu\text{g/ml}$  に分布し、高い感受性を認めている。ところが、EM ではこれよりやや低い感受性であり、環境由来株では  $0.12 \mu\text{g/ml}$  から  $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、臨床由来株では  $0.06 \mu\text{g/ml}$  から  $0.5 \mu\text{g/ml}$  と両由来間でわずかに差が認められた。また、GM では両由来株とも  $1 \mu\text{g/ml}$  から  $2 \mu\text{g/ml}$  に分布し、両由来間で差は認められなかった。

村上らがわが国の臨床由来株について Etest を用いて MIC 測定を行った成績では、特に耐性菌の出現は認められず、諸外国の報告と同様にマクロライド系や RFP に高い感受性を示している<sup>10)</sup>。この成績と今回の温泉水由来株の MIC<sub>90</sub> を比較すると、GM を除く 9 薬剤で臨床由来株の方が MIC 値が低く感受性が高かった。CAM では 32 倍、PIPC では 16 倍以上の差がみられたが、その他の薬剤では温泉水由来株の方が 2 倍から 8 倍高い値を示し、温泉水由来株の感受性はわずかに低かった。このように、温泉水由来株の MIC 分布の方が臨床由来株に比べ、やや耐性側にシフトしている傾向が認められた。



## 結 語

全国各地の温泉浴槽水から分離された *L. pneumophila* 124株について薬剤感受性を検討したところ、供試薬剤10薬剤のうちRFPのMIC<sub>90</sub>が0.125 µg/mlと最も優れた抗菌力を示した。次に、LVFXとIPMが4倍差の0.5 µg/ml、AZMとSPFXが8倍差の1 µg/ml、EM、CAMおよびGMが16倍差の2 µg/mlであった。ところが、MINOは16 µg/ml、PIPCは>256 µg/mlと高い値を示し、それぞれ128倍および4,096倍、RFPより劣っていた。

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) 古畑勝則, 岡部弥穂, 堂ヶ崎知格, 原 元宣, 福山正文 (2002) 土壌からのレジオネラ属菌の分離状況. 防菌防黴, **30**, 555-561.
- 2) 財ビル管理教育センター (2003) 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, 平成14年度厚生労働科学研究費補助金 (健康科学総合研究事業).
- 3) 古畑勝則, 福山正文 (2004) 全国各地の温泉水におけるレジオネラ属菌の生息状況. 環境感染, **19**, 169.
- 4) 古畑勝則, 宮本比呂志, 原 元宣, 福山正文 (2003) 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, **77**, 83-88.
- 5) 古畑勝則, 宮本比呂志, 福山正文 (2004) 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.
- 6) 王 笠 (2000) 日本の冷却塔水と温泉浴槽水由来 *Legionella* 菌種・血清群の分布と塩素・抗菌剤感受性. 阪市医誌, **49**, 49-61.
- 7) 宮良高維, 斎藤 厚 (1998) レジオネラ症. 臨床と微生物, **25**, 137-142.
- 8) Edelstein, P.H. and Meyer, R.D.(1980) Susceptibility of *Legionella pneumophila* to twenty antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **18**, 403-408.
- 9) Orrison, L.H., et al. (1981) Characteristics of environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 109-115.
- 10) 村上日奈子, 他 (2001) 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, **75**, 1-6.

〈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 ヶ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 GVPC $\alpha$  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鈎菌して、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),

tetracycline 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 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 <i>L. pneumophila</i> 6群 <i>L. pneumophila</i> 13群 <i>L. micdadei</i>
38	<i>L. pneumophila</i> 10群	<i>L. pneumophila</i> 6群 <i>L. pneumophila</i> 10群	<i>L. pneumophila</i> 1群 <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 <i>L. pneumophila</i> 6群 <i>L. pneumophila</i> 12群	<i>L. pneumophila</i> 1群 <i>L. pneumophila</i> 4群 <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 <i>L. pneumophila</i> 6群 <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 <i>L. pneumophila</i> 3群 <i>Legionella</i> sp.	<i>L. pneumophila</i> 1群 <i>L. pneumophila</i> 3群	<i>L. pneumophila</i> 1群 <i>L. bozemanii</i>
94	<i>L. pneumophila</i> 3群 <i>L. pneumophila</i> 6群 <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

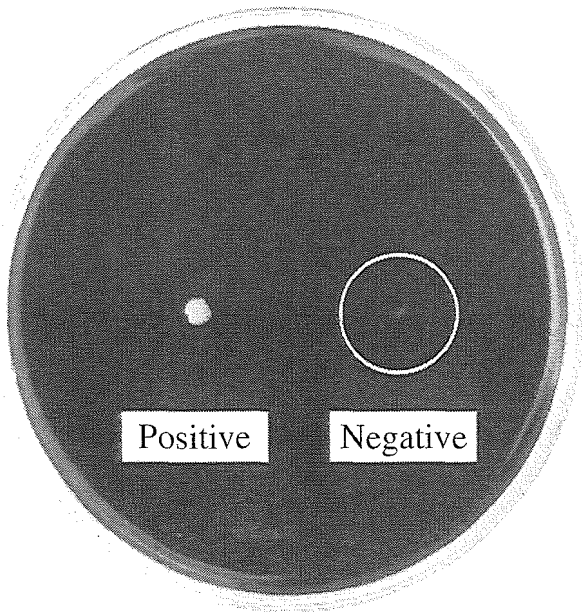


図1 アメーバ寒天法による細胞内増殖性試験  
 左：陽性コントロール NAGASAKI 80045 株  
 右：陰性コントロール 25D 株

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 ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  以上に 14 株 (50%)、PIPC では >256  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  と最も感受性が高く、LVFX は 0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、AZM と IPM は 1  $\mu\text{g/mL}$ 、EM、CAM、SPFX および GM は 2  $\mu\text{g/mL}$  であった。ところが、MINO は 32  $\mu\text{g/mL}$ 、PIPC は >256  $\mu\text{g/mL}$  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、室温で保存した土壌中で *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. 防菌防衛誌 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, 斉藤 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. 菌界展望 1996; 88(3): 722-9.
- 18) 村上日奈子, 松本哲哉, 小林隆夫, 磯貝健次, 榎谷総子, 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]

## Temperature-Regulated Formation of Mycelial Mat-Like Biofilms by *Legionella pneumophila*

Zhenyu Piao,<sup>1</sup> Chun Chau Sze,<sup>2\*</sup> Oksana Barysheva,<sup>1</sup> Ken-ichiro Iida,<sup>1</sup> and Shin-ichi Yoshida<sup>1</sup>

*Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan,<sup>1</sup>  
and School of Biological Sciences, Nanyang Technological University,  
60 Nanyang Drive, Singapore 637551, Singapore<sup>2</sup>*

Received 8 August 2005/Accepted 18 November 2005

Fifty strains representing 38 species of the genus *Legionella* were examined for biofilm formation on glass, polystyrene, and polypropylene surfaces in static cultures at 25°C, 37°C, and 42°C. Strains of *Legionella pneumophila*, the most common causative agent of Legionnaires' disease, were found to have the highest ability to form biofilms among the test strains. The quantity, rate of formation, and adherence stability of *L. pneumophila* biofilms showed considerable dependence on both temperature and surface material. Glass and polystyrene surfaces gave between two- to sevenfold-higher yields of biofilms at 37°C or 42°C than at 25°C; conversely, polypropylene surface had between 2 to 16 times higher yields at 25°C than at 37°C or 42°C. On glass surfaces, the biofilms were formed faster but attached less stably at 37°C or 42°C than at 25°C. Both scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy revealed that biofilms formed at 37°C or 42°C were mycelial mat like and were composed of filamentous cells, while at 25°C, cells were rod shaped. Planktonic cells outside of biofilms or in shaken liquid cultures were rod shaped. Notably, the filamentous cells were found to be multinucleate and lacking septa, but a *recA* null mutant of *L. pneumophila* was unaffected in its temperature-regulated filamentation within biofilms. Our data also showed that filamentous cells were able to rapidly give rise to a large number of short rods in a fresh liquid culture at 37°C. The possibility of this biofilm to represent a novel strategy by *L. pneumophila* to compete for proliferation among the environmental microbiota is discussed.

Legionnaires' disease is a form of pneumonia caused by bacteria of the genus *Legionella*, of which *Legionella pneumophila* is the type species. This infectious disease involves inhalation of aerosols of water containing *Legionella* into the lung. Within the lung, the bacteria are internalized by alveolar macrophages, replicate within the phagosomes, and eventually lyse the host macrophages (27). The genus *Legionella* currently contains as many as 48 species, and at least 20 species are known to be pathogenic to humans (22). Despite this, the general perception is that the species *L. pneumophila* is the main causative agent of Legionnaires' disease, due to the much higher incidence of the disease reported to be caused by *L. pneumophila* than by the other species of the genus (5). One or more of the following reasons could account for this higher incidence. First, lack of diagnostic reagents sufficiently discriminative to identify non-*L. pneumophila* species could lead to inaccurate clinical statistics (22). Second, *L. pneumophila* may be inherently more virulent than other species. However, only a few aspects of its pathogenicity e.g., cytopathogenicity and intracellular multiplication, have currently been shown to be enhanced, compared to non-*L. pneumophila* species (1, 23, 30, 42), providing no strong support for this hypothesis. Third, *L. pneumophila* may be easier to transmit than other *Legionella* species. However, transmission of *L. pneumophila* from humans to humans has not been reported, despite many cases of outbreaks in the recent few decades. Transmission to humans

has reportedly occurred only via mechanical means, such as air-conditioning units, showerheads, and sprinklers (27, 61); therefore, enhanced human-to-human transmissibility is an unlikely reason. Fourth and finally, *L. pneumophila* may have a higher chance than other *Legionella* species of coming into contact with humans. One speculation is that *L. pneumophila* has an innate ability to better survive in the water environment, especially man-made ones. Factors influencing survival of *L. pneumophila* have been studied previously (45), but its survival ability compared to that of other non-*L. pneumophila* species has not been explored.

The habitats for the genus *Legionella* are moist soil and aquatic environments, and outbreaks of legionellosis are often associated with contamination of man-made aquatic environments (for a review, see references 3, 22, and 27). Although *Legionella* bacteria do exist as free-living planktonic forms in the environment, they are more commonly found as intracellular parasites of protozoans such as *Acanthamoeba* spp., *Hartmannella* spp., and *Tetrahymena* spp. (3, 7) and as inhabitants of mixed-community biofilms (51, 62). Biofilms are assemblages of bacteria encased in extracellular polymeric matrices, attached to surfaces or phase boundaries. Being able to form such an adherent, hydrated, and structured community confers several advantages on bacteria for survival in harsh world, e.g., protection from harmful compounds and prevention of desiccation (for a review, see references 15 and 18). *Legionella* has been studied in the context of mixed-community biofilm experimental systems (9, 40, 52) or with the purpose of understanding the efficacy of biocides or biocidal treatments (26, 64, 65), but its ability to form biofilms per se has not been investigated.

\* Corresponding author. Mailing address: School of Biological Sciences, Nanyang Technological University, 60 Nanyang Drive, Singapore 637551, Singapore. Phone: 65-6316 2872. Fax: 65-6791 3856. E-mail: ccsze@ntu.edu.sg.

The initial motivation for this study was to address the question: has *L. pneumophila* better survival ability in terms of biofilm formation than other *Legionella* species? We were particularly interested in differences that may exist at temperatures such as 37°C and 42°C, often encountered in man-made environments, e.g., hot spring spas, in contrast to the more ambient temperature of 25°C. In the course of the investigation, we found that a novel form of biofilm composed of filamentous cells of *L. pneumophila* exists, which may represent another aspect of survival strategy by this organism. Here, we shall report on these findings.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and culture conditions.** *Legionella* spp. were obtained from Gifu Type Culture Collection (GTC) (Table 1). Unless otherwise stated, all strains were grown in buffered yeast extract (BYE) broth (49) at 37°C with shaking or on buffered yeast extract charcoal agar (BYECA; BYE with 0.2% activated charcoal and 1.5% Bacto agar) (37) at 37°C for 3 days. Both types of media were supplemented with 0.4-g/liter of L-cysteine and 0.25-g/liter ferric pyrophosphate, and the pH was adjusted to 6.9 with 1 M potassium hydroxide. Kanamycin at 25 µg/ml was added where necessary.

**Biofilm formation and quantification.** *Legionella* strains were shaken at 37°C for 30 h and then diluted 1:10 to give a final optical density at 600 nm of 0.2 to 0.3. For general observation and quantification, biofilms were allowed to form from 2.2 ml of this diluted culture in round-bottom test tubes (diameter, 12 mm; height, 75 mm) of glass (Pyrex, Iwaki Glass, Japan), polystyrene (PS) (Falcon; Becton Dickinson), and polypropylene (PP) (Sarstedt, Germany), statically incubated in water vapor-saturated incubators set at 25°C, 37°C, or 42°C. For confocal laser scanning microscope (CLSM) observation, biofilms were allowed to form on Micro glass cover slides of 0.8 mm in thickness (Matsunami Glass Ind. Ltd., Japan), vertically immersed in the diluted culture in a thin-layer chromatography tank and similarly incubated at the indicated temperatures.

Quantification of biofilms were performed based on a protocol modified from that of O'Toole et al. (46). Briefly, a one-fifth volume of 0.25% crystal violet solution was added to the biofilm culture, and the biofilm was stained for 15 min. The biofilm was rinsed three times with deionized water, and the crystal violet stain was solubilized in 2 ml of 95% ethanol with shaking and then transferred as 200-µl aliquots (in triplicate) to polystyrene 96-well microtiter plates (Costar; Corning, Inc.). Absorbance at 600 nm was measured with a Wallac 1420 AR-VOSx multilabel plate reader (Perkin-Elmer Life Sciences, Japan).

**Plasmid construction, genetic manipulation, and *recA* mutant generation.** The plasmid pPZ1 carrying the green fluorescent protein (GFP) gene *gfp-mut3\** under the control of the *lacI*-repressible  $P_{\Delta 1/04/03}$  promoter (2) was constructed by standard recombinant DNA techniques (57). A NotI fragment from pJBA27 carrying  $P_{\Delta 1/04/03}$ -*gfp-mut3\** (2) was inserted into the NotI site of pKM330, an RSF1010-based broad-host-range vector derived from pVI397 (58), with the carbenicillin resistance marker replaced by a kanamycin resistance marker (a kind gift from V. Shingler). To visualize *L. pneumophila* directly under CLSM, pPZ1 was introduced via electroporation into the strain, using a Gene-Pulser (Bio-Rad Laboratories Pte. Ltd., Japan).

For the generation of the *recA* mutant, the region encoding the *L. pneumophila recA* gene was PCR amplified with primers 5'-CCAGATTGCTTACTCATCT C-3' and 5'-AGTTGTTCAAGCTCTGCAGC-3', ligated into pGEM-Easy Vector (Promega), and inserted at its internal BamHI site, a 1.7-kb kanamycin resistance cassette from pUT-miniTn5-Km (14). The interrupted *recA* gene was then transferred into the NotI site of pLAW344, which harbors the *sacB* gene that confers sucrose sensitivity and allows counterselection for homologous recombination by double crossover (33). The plasmid was introduced into *L. pneumophila* JR32 (56) and selected for kanamycin and sucrose resistance, and the recombinants were confirmed for allelic replacement via PCR and increased UV sensitivity, as would be expected of a *recA* mutant (17).

**Observation using CLSM, scanning electron microscope (SEM), and transmission electron microscope (TEM).** Glass slides with biofilms formed on both sides by *L. pneumophila* carrying pPZ1 were cleaned on one side with an alcohol swab and mounted on an Eclipse TE2000-U inverted microscope (Nikon) attached to a Radiance 2100 Laser Scanning system (Bio-Rad) to observe the biofilm attached on the intact side. Images were taken under an argon laser source with a dichroic mirror (excitation, 488 nm; emission, 515 nm) and processed by LaserSharp 2000 (Bio-Rad) software.

For EM observation, biofilms formed on the glass test tubes were transferred

TABLE 1. *Legionella* strains used in this study

Species (serogroup)	Strain (GTC <sup>a</sup> designation)	Numerical designation in Fig. 1
<i>L. pneumophila</i>		
<i>L. pneumophila</i> (1)	Philadelphia-1 (GTC 9134 <sup>b</sup> )	1
<i>L. pneumophila</i> (1)	Knoxville-1 (GTC 9135)	2
<i>L. pneumophila</i> (2)	Togus-1 (GTC 9136)	3
<i>L. pneumophila</i> (3)	Bloomington-2 (GTC 9137)	4
<i>L. pneumophila</i> (4)	Los Angeles-1 (GTC 9246 <sup>b</sup> )	5
<i>L. pneumophila</i> (5)	Dallas-1E (GTC 9139)	6
<i>L. pneumophila</i> (6)	Chicago-2 (GTC 9138)	7
<i>L. pneumophila</i> (7)	Chicago-8 (GTC 10064)	8
<i>L. pneumophila</i> (8)	Concord-3 (GTC 10065)	9
<i>L. pneumophila</i> (9)	IN-23-G <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> (GTC 10738)	10
<i>L. pneumophila</i> (10)	Leiden-1 (GTC 11369)	11
<i>L. pneumophila</i> (11)	797-PA-H (GTC 11365)	12
<i>L. pneumophila</i> (5)	U8W (GTC 1356 <sup>b</sup> )	13
Non- <i>L. pneumophila</i> species		
<i>L. bozemanii</i> (1)	ATCC <sup>c</sup> 33217 (GTC 9140 <sup>b</sup> )	14
<i>L. micdadei</i> (NR <sup>d</sup> )	ATCC 33218 (GTC 9141 <sup>b</sup> )	15 <sup>e</sup>
<i>L. gormanii</i> (NR)	ATCC 33279 (GTC 9142 <sup>b</sup> )	16 <sup>f</sup>
<i>L. dumoffii</i> (NR)	ATCC 33343 (GTC 9244)	17 <sup>f</sup>
<i>L. longbeachae</i> (1)	ATCC 33462 (GTC 9245 <sup>b</sup> )	18 <sup>f</sup>
<i>L. dumoffii</i> (NR)	ATCC 33279 (GTC 9247 <sup>b</sup> )	19
<i>L. oakridgensis</i> (NR)	ATCC 33761 (GTC 10061 <sup>b</sup> )	20
<i>L. wadsworthii</i> (NR)	ATCC 33877 (GTC 10062 <sup>b</sup> )	21
<i>L. feeleii</i> (1)	ATCC 35072 (GTC 10063 <sup>b</sup> )	22 <sup>g</sup>
<i>L. longbeachae</i> (2)	ATCC 33484 (GTC 10066)	23
<i>L. sainthelensii</i> (1)	ATCC 35248 (GTC 10392 <sup>b</sup> )	24
<i>L. bozemanii</i> (2)	ATCC 35545 (GTC 10739)	25
<i>L. hackeliae</i> (1)	ATCC 35250 (GTC 10740 <sup>b</sup> )	26
<i>L. jamestowniensis</i> (NR)	ATCC 35298 (GTC 10741 <sup>b</sup> )	27 <sup>g</sup>
<i>L. rubrilucens</i> (NR)	ATCC 35304 (GTC 10743 <sup>b</sup> )	28
<i>L. feeleii</i> (2)	ATCC 35849 (GTC 10744)	29
<i>L. maceachernii</i> (NR)	ATCC 35300 (GTC 10745 <sup>b</sup> )	30
<i>L. spiritiensis</i> (NR)	ATCC 35249 (GTC 11199 <sup>b</sup> )	31 <sup>h</sup>
<i>L. israelensis</i> (NR)	ATCC 43119 (GTC 11367 <sup>b</sup> )	32
<i>L. hackeliae</i> (2)	ATCC 35999 (GTC 11368)	33
<i>L. parisiensis</i> (NR)	ATCC 35299 (GTC 11745 <sup>b</sup> )	34
<i>L. erythra</i> (NR)	ATCC 35303 (GTC 11748 <sup>b</sup> )	35 <sup>h</sup>
<i>L. birminghamensis</i> (NR)	ATCC 43702 (GTC 11749 <sup>b</sup> )	36
<i>L. anisa</i> (NR)	ATCC 35292 (GTC 12075 <sup>b</sup> )	37 <sup>g</sup>
<i>L. cincinnatiensis</i> (NR)	ATCC 43753 (GTC 12201 <sup>b</sup> )	38
<i>L. quinlivanii</i> (NR)	ATCC 43830 (GTC 12648 <sup>b</sup> )	39
<i>L. moravica</i> (NR)	ATCC 43877 (GTC 12649 <sup>b</sup> )	40 <sup>h</sup>
<i>L. brunensis</i> (NR)	ATCC 43878 (GTC 12655 <sup>b</sup> )	41 <sup>h</sup>
<i>L. tusconensis</i> (NR)	ATCC 49180 (GTC 12656 <sup>b</sup> )	42
<i>L. jordani</i> (NR)	ATCC 33623 (GTC 12657 <sup>b</sup> )	43
<i>L. adelaidensis</i> (NR)	ATCC 49625 (GTC 13562 <sup>b</sup> )	44 <sup>h</sup>
<i>L. fairfieldensis</i> (NR)	ATCC 49588 (GTC 13563 <sup>b</sup> )	45
<i>L. gratiana</i> (NR)	ATCC 49413 (GTC 13564 <sup>b</sup> )	46 <sup>h</sup>
<i>L. lansingensis</i> (NR)	ATCC 49751 (GTC 13565 <sup>b</sup> )	47
<i>L. geestiana</i> (NR)	ATCC 49504 (GTC 13568 <sup>b</sup> )	48
<i>L. londiniensis</i> (NR)	ATCC 49505 (GTC 13635 <sup>b</sup> )	49
<i>L. nautarum</i> (NR)	ATCC 49506 (GTC 13636 <sup>b</sup> )	50 <sup>h</sup>
<i>L. worsteiensis</i> (NR)	ATCC 49508 (GTC 13638 <sup>b</sup> )	51 <sup>h</sup>

<sup>a</sup> GTC, Gifu Type Culture Collection, Department of Microbiology, Gifu University School of Medicine, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1194, Japan.

<sup>b</sup> Type strain.

<sup>c</sup> ATCC, American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209.

<sup>d</sup> NR, not reported.

<sup>e</sup> At 25°C, less-robust growth was observed on BYECA.

<sup>f</sup> At 37°C, less-robust growth was observed on BYECA.

<sup>g</sup> At 42°C, less-robust growth was observed on BYECA.

using a toothpick into glass petri dishes and washed briefly with deionized water. They were fixed with 2% glutaraldehyde for 2 to 3 h and then additionally with 1% OsO<sub>4</sub> in the case of TEM observation. Subsequent dehydration was performed step wise using 50%, 70%, 90%, 95%, 99.5%, and 100% ethanol. For SEM observation, the ethanol was replaced by isoamyl acetate and then liquid CO<sub>2</sub>, which was allowed to vaporize gradually. Following this, the samples were coated with 60% gold-40% palladium alloy powder. For TEM observation, dehydrated samples were embedded in Epon resin, ultrathin sectioned, and stained with uranyl acetate, followed by lead citrate. The samples were examined with or without using a scanning image-observing device attached to a JEOL JEM 2000EX electron microscope.



**Nucleoid staining of filamentous cells.** Filamentous cells from *L. pneumophila* biofilms were teased on glass slides to separate the strands and stained according to a modified version of HCl-Giemsa staining (50). Briefly, the preparation was fixed in OsO<sub>4</sub> vapor for 45 min, treated with 1 M hydrochloric acid at 60°C for 10 min, rinsed, and stained with Giemsa stain for 5 min, followed by phosphate buffer (pH 6.4) for 5 min. The air-dried preparation was observed under an oil immersion lens on a light microscope (Olympus).

**Monitoring distribution of filamentous and rod-shaped cells.** Biofilms formed on glass test tubes or colonies formed on agar were picked by toothpicks and spread extensively on glass slides for ease of examination of individual cells. For observation of cells in the medium surrounding biofilms, aliquots of the medium were taken with care to avoid disturbing the biofilms, centrifuged briefly to collect the cells in pellets, and then spread on glass slides. Cells from shaken culture were similarly collected and spread. Slides with these preparations were flame fixed, stained with Pfeiffer stain, and observed under oil immersion by a light microscope. Images in three different fields were processed with the Image-Pro 3D Suite (Media Cybernetics, Inc.) to quantify the number of pixel units for images of the filamentous and rod-shaped forms. The percentage of biovolume of filamentous cells was calculated as  $100 \times (\text{pixel units for filamentous cells} / \text{pixel units for all cells})$ .

**Growth of cells from biofilm and planktonic culture.** Biofilms cultured for 4 days in glass test tubes were collected with Pasteur pipettes and rinsed briefly in sterile deionized water. They were then transferred into a test tube containing 5 ml of AC buffer [4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 3.4 mM sodium citrate, 2.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20-mg/liter Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, pH 6.5] and shaken vigorously for 1 h to physically separate the filaments. A microscopic check of this suspension revealed that 90% of the cells were untangled from each other. For the "planktonic control," a 30-h shaken culture in BYE was diluted 1:100 in 5 ml AC buffer and shaken similarly for 1 h. Aliquots (each, 4 ml) of the biofilm cell-derived and planktonic cell-derived suspensions were then transferred to conical flasks, each containing 66 ml of fresh BYE broth. Growth was monitored at 4-h intervals by counting the bacterial CFU on buffered yeast extract charcoal agar.

## RESULTS

**Biofilm formation by *Legionella* spp.** To assess the ability of *Legionella* spp. to form biofilms, particularly to compare *L. pneumophila* to non-*L. pneumophila* species, we utilized 13 strains of *L. pneumophila* and 38 strains of other *Legionella* spp. (Table 1). This gives a good representation of the genus *Legionella*. The experimental system is a static culture in the BYE broth medium, and three different materials (glass, PS, and PP) were chosen as surfaces for biofilm growth at three temperatures (25°C, 37°C, and 42°C). The growth of all test strains in BYE liquid and agar media at the experimental temperatures was checked to ensure that any inability to form a biofilm was not due to nonoptimal growth conditions. A preliminary experiment, in which biofilm formation was noted daily by eye over a period of 30 days, indicated that stable biofilms could be observed from day 11 at 25°C and from day 3 at 37°C or 42°C. The biofilms formed were therefore quantified by crystal violet staining on day 12 for the 25°C cultures and day 4 for the 37°C and 42°C cultures. The results are presented in Fig. 1. Statistical analysis of the data indicated that at 37°C and 42°C on glass and PS (Fig. 1A and B) and at 25°C on PP (Fig. 1C), *L. pneumophila* strains have significantly greater biofilm-forming capacity than all other *Legionella* spp.

**Quantity, speed of formation, and adherence stability of *L. pneumophila* biofilms.** In the above data, the quantity of the biofilms formed by *L. pneumophila* strains (Fig. 1, strains 1 to 13) was observed to be influenced by temperature. On glass and PS surfaces (Fig. 1A and B), biofilms were generally formed more extensively at the higher temperatures than at 25°C: biofilms at 37°C were two- to sevenfold higher (glass) and two- to fourfold higher (PS) in yield and at 42°C were

three- to fivefold higher (glass) and two- to fivefold higher (PS) in yield. On PP surfaces, the situation was reversed: at 25°C, 2- to 7-fold and 3- to 16-fold more biofilms were formed than at 37°C and 42°C, respectively.

The temperature dependence could also be observed in the speed of formation and the adherence stability of the biofilms of *L. pneumophila* strains. In three to five independent experiments looking at biofilm formation by the 13 *L. pneumophila* strains in glass test tubes, we documented (i) the number of days it took for the appearance of stable biofilms, as an indicator of the speed of biofilm formation; and (ii) the day at which the biofilms were observed to naturally detach from the walls of the test tubes, as an indicator of the adherence stability. Statistical analysis revealed that all *L. pneumophila* strains showed similar trends: at 25°C, biofilms were formed more slowly ( $12 \pm 1$  days) but remained stably attached throughout the 30-day period of observation. At 37°C and 42°C, biofilms were formed faster ( $3 \pm 1$  days), but adherence stability was lower ( $7 \pm 1$  days). Similar trends in the speed of biofilm formation were observed when biofilms were grown on PS or PP, but the difference in adherence stability was not as apparent (data not shown).

**Thickness and structure of *L. pneumophila* biofilms.** The temperature dependence may have biological significance related to possible survival advantages of *L. pneumophila* in man-made environments over non-*L. pneumophila* species. To look further into this, *L. pneumophila* strain Knoxville-1 was chosen as a representative of the 13 *L. pneumophila* strains for in-depth structural observation. We introduced pPZ1, which allows constitutive expression of the GFP into Knoxville-1 strain for visualization of its biofilms in the natural hydrated state by CLSM. The GFP-expressing Knoxville-1 strain showed biofilm formation properties at the three temperatures, similar to those of the wild-type Knoxville-1 strain (data not shown), indicating that the expression of GFP does not observably affect the gross phenomenon under study.

Biofilms were allowed to form on glass slides immersed in BYE broth and then observed directly under CLSM on the indicated days (chosen to arbitrarily represent an early and a mature stage of biofilm formation) to quantify the thickness (Table 2). Biofilms at 37°C and 42°C were found to be indeed thicker than that at 25°C by about twofold. In terms of structures, biofilms at 25°C (Fig. 2A) possessed features typical of biofilms reported to date, i.e., pillar- and mushroom-like structures and what seemed like water channels within (15). Biofilms at 37°C, however, showed an even and extensive mat of considerably greater cell density without the commonly observed water channel structures (Fig. 2B).

**Morphology of *L. pneumophila* cells in biofilms.** It was apparent that *L. pneumophila* biofilms at 37°C did not have the typical biofilm features (16) shown by most bacteria. At higher magnifications, cells within biofilm at 25°C showed the normal morphology of *L. pneumophila*, i.e., they were rod shaped (Fig. 2C). In contrast, the morphology of cells in biofilm at 37°C was filamentous (Fig. 2D). The meshwork of filaments resembled the mycelia of fungi; hence, we tentatively refer to it as a "mycelial mat-like biofilm." Filamentation of bacterial cells is sometimes associated with physiological abnormalities such as mutations or overexpression of certain proteins (8, 13). To check if the filamentation was an artifact due to *gfp* overex-

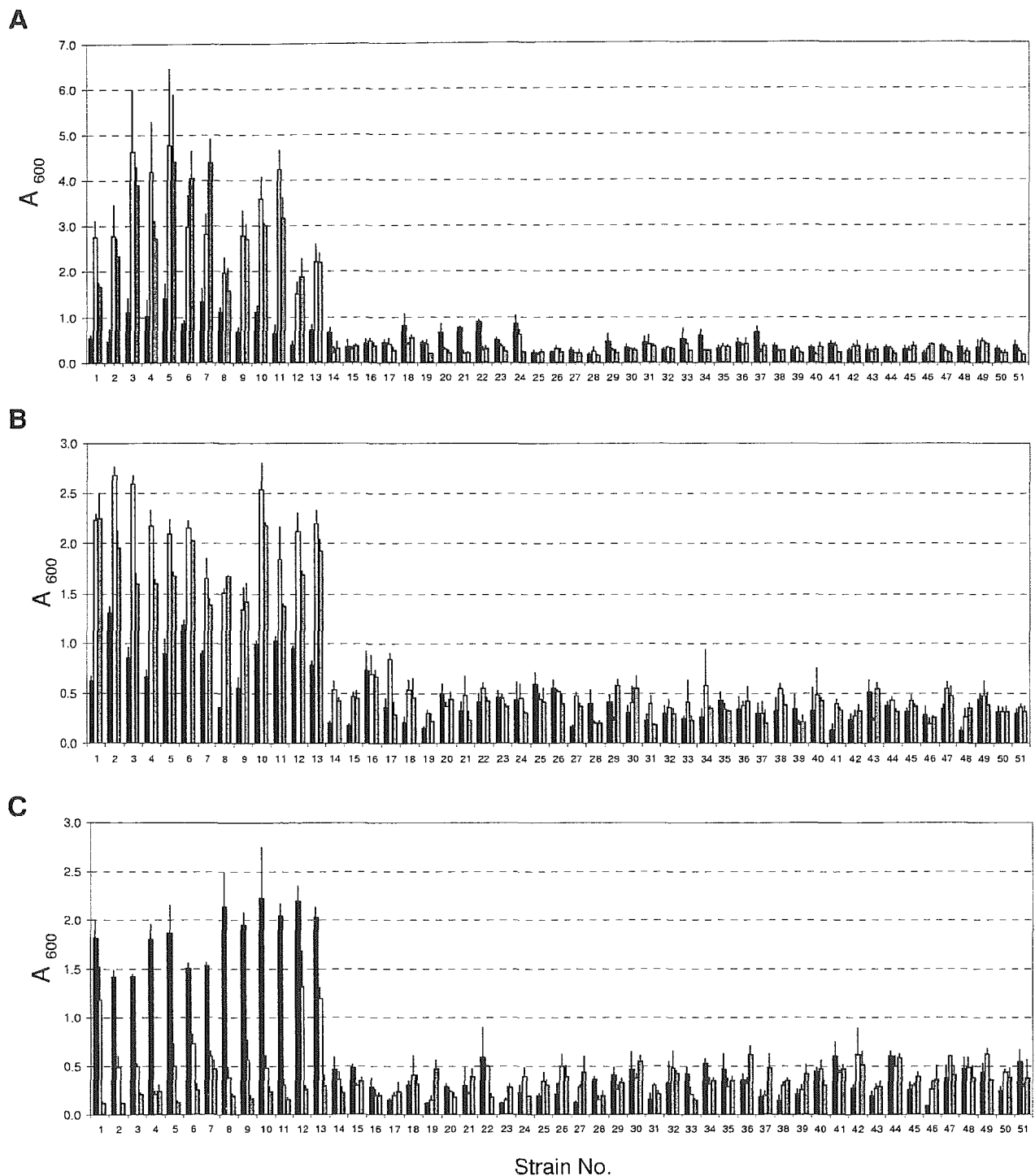


FIG. 1. Quantification of biofilms (as described in Materials and Methods) formed by *Legionella* spp. on surfaces of glass (A), polystyrene (B), and polypropylene (C) at incubation temperatures of 25°C (black bars), 37°C (white bars), and 42°C (gray bars). Strains or species are indicated as strain numbers and presented in Table 1. Values are presented as a means  $\pm$  standard deviation (SD) of three to six independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's *t* test to compare the differences between groups, and *P* values of  $<0.05$  were considered statistically significant.

TABLE 2. Thickness of GFP-expressing *L. pneumophila* Knoxville-1 biofilm

Temperature (°C)	Day	Mean thickness <sup>a</sup> (μm)
25	9	20.4 ± 6.3
25	18	42.3 ± 10.9
37	3	37.5 ± 2.8
37	6	71.6 ± 4.4
42	3	40.3 ± 2.2
42	6	73.2 ± 3.5

<sup>a</sup> Values were obtained as means ± SD of six to eight measurements of thickness. Statistical analysis was performed using Student's *t* test to compare the differences between groups, and *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

pression, we collected the biofilm formed by the wild-type Knoxville-1 strain at 37°C and prepared it for observation under the SEM. The electron micrograph (Fig. 2E) showed a filamentous meshwork similar to that seen by CSLM, ruling out the possibility of artifacts. Hence, the morphology of *L. pneumophila* cells in the biofilms formed on glass (and likewise on PS and PP surfaces) (data not shown) appears to be regulated by temperature.

**Distribution of rod-shaped and filamentous cells under different growth conditions.** The distribution of the morphological forms under differing growth conditions was next examined. We systematically assessed the relative contribution of filamentous cells to the total biovolume (i) within biofilms grown on glass, (ii) in the surrounding media, (iii) in colonies grown on agar, and (iv) in shaken cultures. At 25°C (Fig. 3, black bars), the static culture showed a consistent dominance by rod-shaped cells, both within the biofilm and outside (i.e., in the medium), throughout the period of observation. At 37°C and 42°C (Fig. 3, white and gray bars) the biofilms showed that close to 90% of the total biovolume consisted of filamentous cells as early as day 2 and continued to be dominated by the filamentous form until day 7. Upon detachment from the vessel walls (day 11 and day 13), these detached biofilms retained their mycelial characteristics. However, within the surrounding media of biofilms at 37°C and 42°C, rod-shaped cells were in the majority. Shaken cultures were predominantly rod shaped; it should be noted that at 37°C and 42°C, predominance of rod-shaped cells was maintained even up to day 3. Agar plate culture, on the other hand, showed a profile for distribution of forms similar to that observed in biofilms at the three temperatures.

**Filamentous cells are multinucleate and nonseptate.** The filamentous cells in *L. pneumophila*'s biofilm were stained for their nucleoids and found to be clearly multinucleate (Fig. 2F). This indicates that the filamentous form within the biofilm is one whereby DNA replication has proceeded in the absence of cell division. Indeed, observation by TEM showed the total lack of septa within the filamentous cells (Fig. 2G).

**Temperature-regulated filamentation in *L. pneumophila* is not RecA dependent.** The filaments formed as a result of non-septation, observed with *L. pneumophila* biofilms when cultured at higher temperatures, is reminiscent of the phenotype of the thermosensitive *recA* mutants of *Escherichia coli*. RecA in *E. coli* is a regulator involved in the SOS response induced

by DNA damage, and an abnormality in this regulator has been reported to result in filamentation at the elevated temperature of 40°C (10, 28). This is due to the control of RecA on factors involved in cell division, e.g., FtsZ (39) and SulA (20), both of which require well-regulated expression levels to ensure normal septation. A RecA homologue in *L. pneumophila* has been found to be able to functionally complement the *E. coli* counterpart and appears to be similarly regulated (17). The possible involvement of RecA in temperature-dependent filamentation by *L. pneumophila* cells was checked. An insertional null mutant of *recA* was generated in strain JR32, a *L. pneumophila* Philadelphia-1 derivative amenable to genetic manipulation (56) and observed to be able to form biofilms in a manner similar to that of the wild type, showing temperature-regulated morphological forms. Thus, the *recA* gene in *L. pneumophila* appears not to be responsible for the temperature-regulated filamentation phenomenon.

**Growth of cells from mycelial biofilm.** The fact that the filamentous form of *L. pneumophila* is multinucleate but non-septate suggests that, given favorable conditions, the formation of septa may quickly give rise to more daughter cells than rod-shaped cells, since multiple DNA replication could be assumed to have already proceeded to completion during the filamentous state. To test this hypothesis, we mechanically "unraveled" a mature mycelial biofilm from a 37°C day 4 culture of Knoxville-1 strain by extensive shaking in a suitable buffer. We then followed the growth of its cells in fresh BYE medium shaken at 37°C over 36 h and compared it to that of the rod-shaped cells, seeded from a 30-h shaken culture (Fig. 4). The assumption is that one filamentous cell before septation will appear as one CFU. The rod-shaped cell culture continued in its lag phase until 12 h, but the culture from mycelial biofilm entered exponential phase by 8 h and mostly converted to rod-shaped cells. This shortened lag phase was remarkable, considering that cells from the biofilm were 4 days old and therefore expected to have an even longer lag phase than cells from a 30-h-old shaken culture. The growth rate (gradient at exponential phase) for the mycelial mat-like culture was not significantly higher than that for the rod-shaped cell culture during their respective exponential phases. Hence, the filamentous form of *L. pneumophila* seems to allow the organism to proliferate particularly rapidly in the initial stage, more than does the normal rod-shaped form.

## DISCUSSION

The ability to form biofilms provide a bacterium with survival advantages in the environment, e.g., anchorage at a location where growth is favorable, protection from desiccation, and resistance to biocides and detergents (15, 16, 18). Under the conditions used in this study, the 13 strains of *L. pneumophila* tested showed enhanced biofilm formation compared to other non-*L. pneumophila* strains: at 37°C and 42°C on glass and PS surfaces (Fig. 1A and B) and at 25°C on PP surfaces (Fig. 1C). To some extent, this may be due to the less-robust growth of a few non-*L. pneumophila* strains at specific temperatures (Table 1, footnotes e to g) in a medium optimized for cultivation of *L. pneumophila*, but these are minor exceptions. Within the genus *Legionella*, *L. pneumophila* is the species most often associated with human clinical cases (22). One

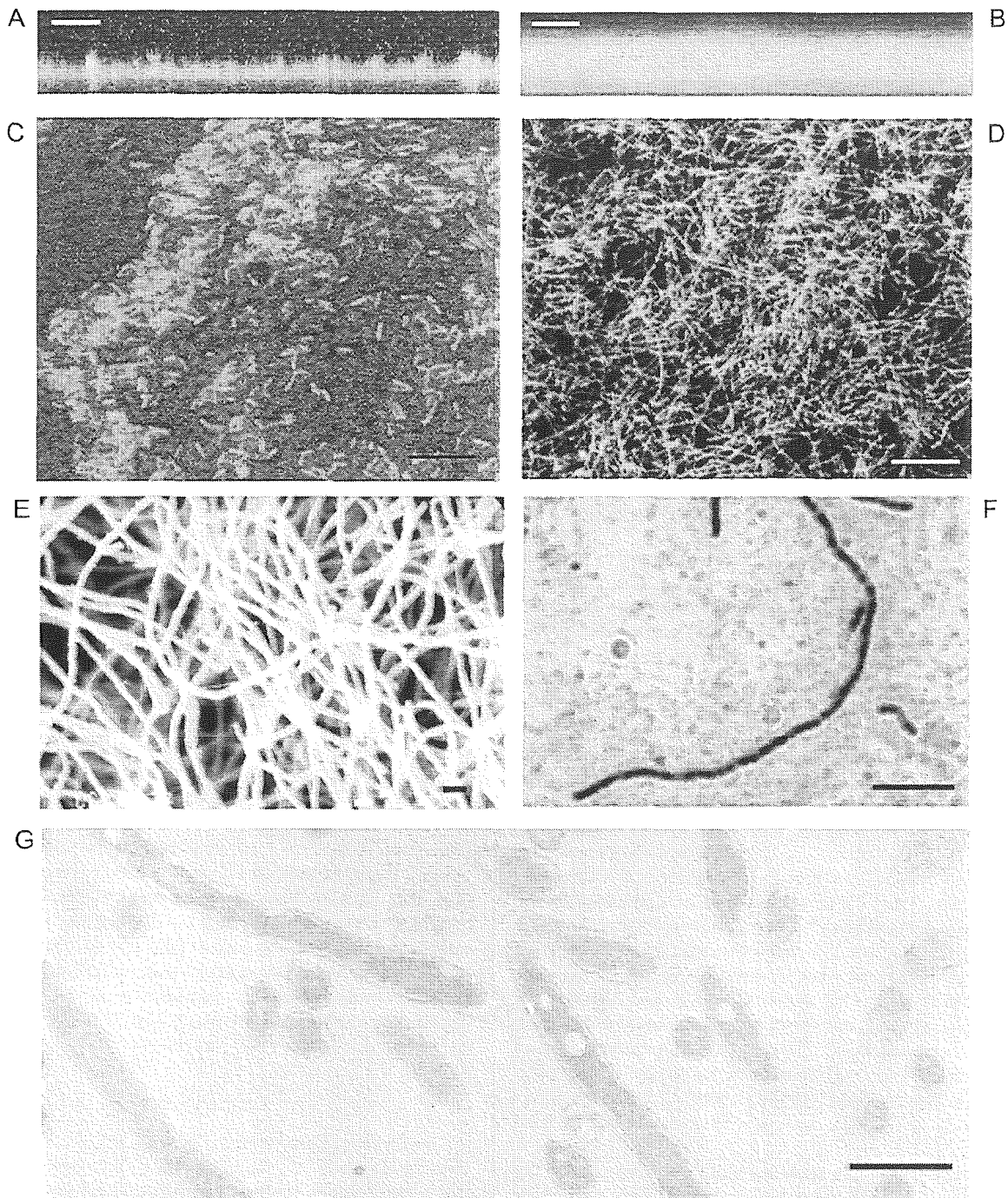


FIG. 2. Structure of *L. pneumophila* biofilms. The *L. pneumophila* Knoxville-1 strain expressing GFP was observed under CSLM (A to D). *x-z* plane projection of 25°C biofilm at day 18 (A) and 37°C biofilm at day 6 (B); *x-y* plane projection of 25°C biofilm at day 8 (C) and 37°C biofilm at day 4 (D). The *L. pneumophila* Knoxville-1 biofilm at 37°C on day 4 was observed under scanning electron microscope (E), and its filamentous cell stained with HCl-Giemsa was observed under the light microscope (F). (G) A section of the filamentous cells of *L. pneumophila* Philadelphia-1 strain was observed under the transmission electron microscope. Bars, 50  $\mu\text{m}$  (A and B), 10  $\mu\text{m}$  (C and D), 1  $\mu\text{m}$  (E), 5  $\mu\text{m}$  (F), and 1  $\mu\text{m}$  (G). Images were processed and compiled with Adobe Photoshop 7.0 software.

speculation is that it is better able to survive in man-made environments than non-*L. pneumophila* species and hence has a greater chance of crossing paths with the human population. Our finding that *L. pneumophila* is more proficient at biofilm

formation than other *Legionella* species supports this speculation. Since the temperatures 37°C and 42°C are often encountered in man-made aquatic environments, e.g., air-conditioning cooling towers in the summer and hot spring spas, the