

図3 神奈川県内公衆浴場脱衣室及び浴室中のトリハロメタン濃度 (2007年2月採取試料)

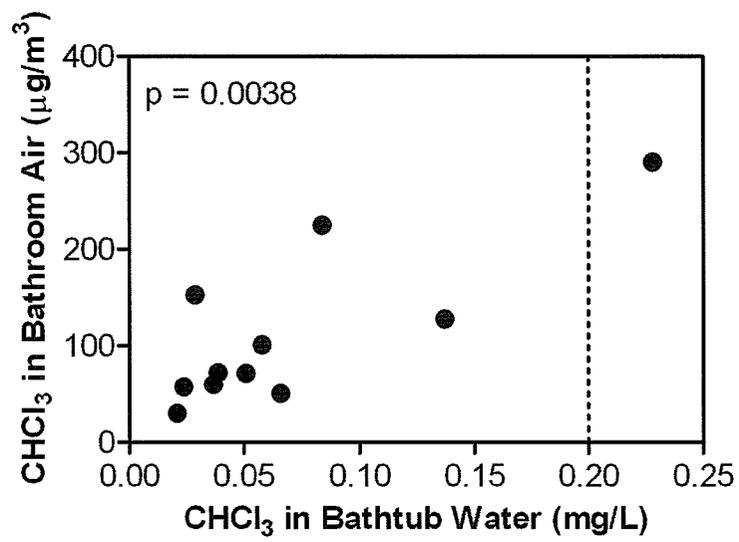


図4 浴槽水及び浴室空气中のクロロホルム濃度の相関

浴槽水からのレジオネラ属菌の検出状況 —*Legionella pneumophila* 血清群 1 の増加—

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

研究要旨：わが国では循環式入浴施設における集団感染事例が 2000 年、2002 年と続発し、その後に入浴施設の衛生管理が強化された。これまで浴槽水について菌種・血清群を詳細に同定し、年度別推移を含めた大規模な調査報告はない。そこで、全国の多数の浴槽水からレジオネラ属菌を分離し、生息状況を評価した。

2001 年度から 2006 年度 (9 月まで) に依頼された 24,250 検体 (毎年 1600 検体以上) の浴槽水を対象とした。2001 年、2002 年、2005 年の保存株と、2006 年の全分離株について菌種と血清群の同定を行った。

レジオネラ属菌陽性であった検体の比率は、2001 年の 29% から 2006 年の 10% まで低下した。同様に 100 mL 当りの菌数も年度により漸減した。集団感染事例でみられた $10^4/100\text{mL}$ 以上の菌数の検体は、1.2% 未満であった。*Legionella pneumophila* (Lp) 血清群 (SG) 5 が 2001 年度には、最も多かったが、その後 SG1 が最も多くなり、SG3、4 の比率が減少した。詳細に調べた 2005 年、2006 年では、Lp SG1、untypable、5、6 の順に多く、それぞれ 10% を超えていた。

A. 研究目的

わが国では循環式入浴施設における集団感染事例が 2000 年、2002 年と続発し、その後に入浴施設の衛生管理が強化された。これまで浴槽水について菌種・血清群を詳細に同定し、年度別推移を含めた大規模な調査報告はない。そこで、全国の多数の浴槽水からレジオネラ属菌を分離し、生息状況を評価した。

B. 研究方法

2001 年度から 2006 年度 (9 月まで) に依頼された 24,250 検体 (毎年 1600 検体以上) の浴槽水を対象とした。2001 年、2002 年はデンカ生研の 10 種の免疫血清で、2005 年、2006 年は、デンカ生研の 19 種の免疫血清とレジオネラ・レファレンスセンターで作製した 4 種の免疫血清を用いスライド凝集テストを行い、年度当り 286 株から 1,499 株同定した。必要に応じて自発蛍光の観察による分類、*L. pneumophila* (Lp) 特異的な *mip* プライマーによる PCR、DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH レジオネラ極東)、16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定を行い、菌種を同定した。

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

C. 研究結果

レジオネラ属菌陽性であった検体の比率は、2001 年の 29% から 2006 年の 10% まで低下した (図 1)。同様に 100 mL 当りの菌数も年度により漸減した (図 2)。集団感染事例でみられた $10^4/100\text{mL}$ 以上の菌数の検体は、1.2% 未満であった。Lp 血清群 (SG) 5 が 2001 年度には、最も多かったが、その後 SG1 が最も多くなり、SG3、4 の比率が減少した (図 3)。詳細に調べた 2005 年、2006 年では、LpSG1、untypable、5、6 の順に多く、それぞれ 10% を超えていた。

D. 考察

古畑らの2003年度の温泉水の調査でもLpSG1が最も多くなっている(感染症学雑誌78巻、p710、2004)。海外の給湯水の調査でも、塩素濃度の高い水にLpSG1が多いという(Borellaら、Emerging infectious Diseases 10:p457、2004; Applied and Environmental Microbiology 71:p5805、2005)。入浴施設における塩素の使用とともに、臨床分離株として多いLpSG1の増加傾向は注目すべきである。ただし、塩素濃度が十分であれば、この菌種も殺菌されることは確かである(藪内ら、感染症学雑誌69巻、p151、1995)。

E. 結論

2001年度、2002年度に比べ、2005年度、2006年度は、浴槽水分離株の内、大規模集団感染事例の起因菌であるLpSG1割合が増え、検体当りのレジオネラ属菌の陽性率は低下しているにもかかわらず、LpSG1の陽性率は低下していない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Amemura-Maekawa J, Hayakawa Y, Sugie H, Moribayashi A, Kura F, Chang B, Wada A, Watanabe H: Legiolulin, a new isocoumarin compound responsible for blue-white autofluorescence in *Legionella (Fluoribacter) dumoffii* under long-wave length UV light, Biochem Biophys Res Commun 323 (3):954-959, 2004.
- 2) Chang B, Amemura-Maekawa J, Kura F, Kawamura I, Watanabe H: Expression of IL-6 and TNF- α in human alveolar epithelial cells is induced by invading, but not by adhering, *Legionella pneumophila*. Microb Pathog 37: 295-302, 2004.
- 3) Chang B, Kura F, Amemura-Maekawa J, Koizumi N, Watanabe H: Identification of a novel adhesion molecule involved in virulence of *Legionella pneumophila*. Infect Immun 73: 4272-4280, 2005.
- 4) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, and Watanabe H: *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan from a distinct genetic cluster. Microbiol Immunol 49:1027-1033, 2005.
- 5) 岡田美香, 河野喜美子, 倉 文明, 前川純子, 渡辺治雄, 八木田健司, 遠藤卓郎, 鈴木 泉: 循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 I. 発症状況と環境調査、感染症誌 79(6):365-74、2005。
- 6) 河野喜美子, 岡田美香, 倉 文明, 前川純子, 渡辺治雄: 循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 II. 診断検査法の比較、感染症誌 81(2):173-82、2007。
- 7) Kobayashi S, Kura F, Amemura-maekawa J, Chang B, Yamamoto N, Watanabe H: Locus on chromosome 13 in mice involved in clearance of *Legionella pneumophila* from the lungs. p.310-312. In Cianciotto NP et al. (ed.) *Legionella* :State of the Art 30 Years after Its Recognition, ASM Press, Washington, D. C., 2006.
- 8) Kura F, Amemura-Maekawa J, Yagita K, Endo T, Ikeno M, Tsuji H, Taguchi M, Kobayashi K, Ishii E, Watanabe H: Outbreak of legionnaires' disease on a cruise ship linked to spa-bath filter stones contaminated with *Legionella pneumophila* serogroup 5. Epidemiol Infect 134:385-91, 2006.
- 9) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Watanabe H: Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis and sequence-based typing (SBT) of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from Japan. p.159-162. In Cianciotto NP et al. (ed.) *Legionella* :State of the Art 30 Years after Its Recognition, ASM Press, Washington, D. C., 2006.

2. 学会発表

- 1) 小林静史, 倉 文明, 前川純子, 高橋朋子, 渡辺治雄: *Legionella pneumophila* 感染における Lgn1 遺伝子の機能についてコンジェニックマウスを用いた解析, 第77回日本細

菌学会総会，2004年4月，大阪。

2) 前川純子、倉 文明、常 彬、渡辺治雄： *Legionella pneumophila* 血清群 1 の sequence-based typing (SBT)，第 78 回日本細菌学会総会，2005 年 4 月，東京。

3) 倉 文明：レジオネラ感染症の現状と展望、特別講演、第 18 回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会、2006 年 2 月、長野。

4) Kura F, Kobayashi S, Amemura-Maekawa J, Aratani Y, Suzuki K, Watanabe H: Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Legionella pneumophila*. 6th International Conference on Legionella. October 2005, Chicago, USA.

5) Kawano K, Okada M, Kura F, Amemura-Maekawa J, Watanabe H: The largest outbreak of legionellosis in Japan associated with spa baths: Diagnostic tests. 21st Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Lisbon, Portugal. May 2006.

6) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Suzuki-Hashimoto A, Ichinose M, Watanabe H: Typing of *Legionella pneumophila* isolates in Japan by *flaA* gene. 21st Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Lisbon, Portugal. May 2006.

2. 総説

1) 倉 文明：今ふえているレジオネラ症-その正体と予防対策，食と健康，48(7)：54-63，2004。

2) 倉 文明、前川純子、渡辺治雄：レジオネラ症、感染症の事典（国立感染症研究所学友会編）、265-6，朝倉書店、東京、2004。

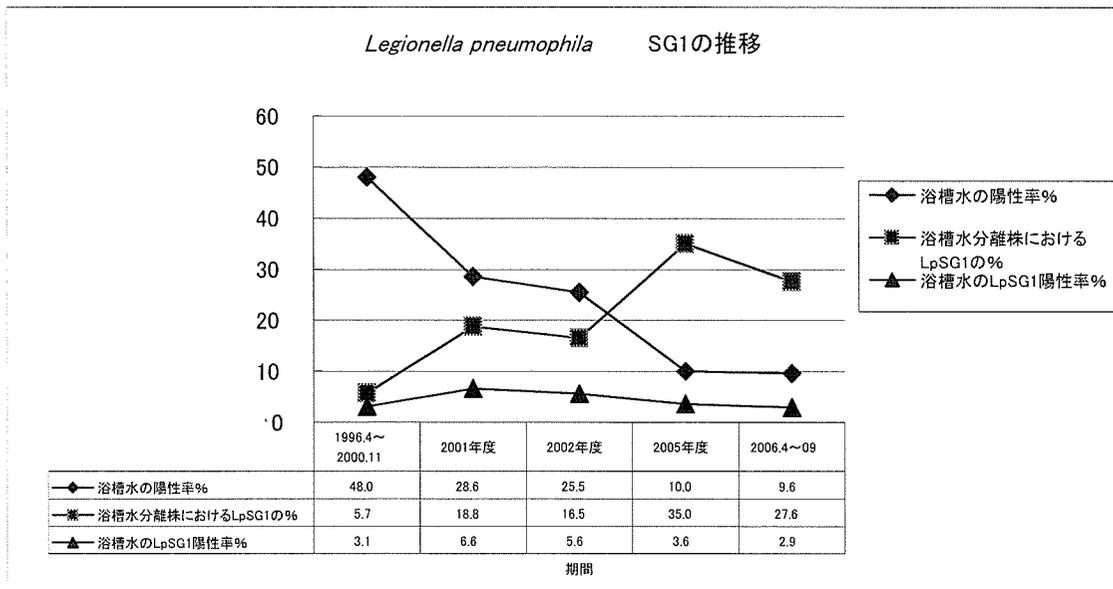
3) 倉 文明：微生物感染と NOX、生体防御医学事典（鈴木和男監修）、218-22、朝倉書店、東京、印刷中。

4) 倉 文明、登坂直規、渡辺治雄：日本と世界のレジオネラ感染症情報、わが国の感染症法に基づいた届け出の現状、レジオネラ感染症ハンドブック（斉藤 厚編）、254-66、日本医事新報社、東京、2006。

5) 倉 文明、常 彬、前川純子(アイウエオ順)：レジオネラ、図説 呼吸器系細菌感染症：疫学、診断、治療（荒川宜親、渡辺治雄監修，佐々木次雄編集）、105-22，じほう、東京、2006。

G. 知的所有権の取得状況
なし。

図 1



2000年11月までの項は、鈴木敦子ら、感染症学雑誌 76 巻 703 頁による。

図 2

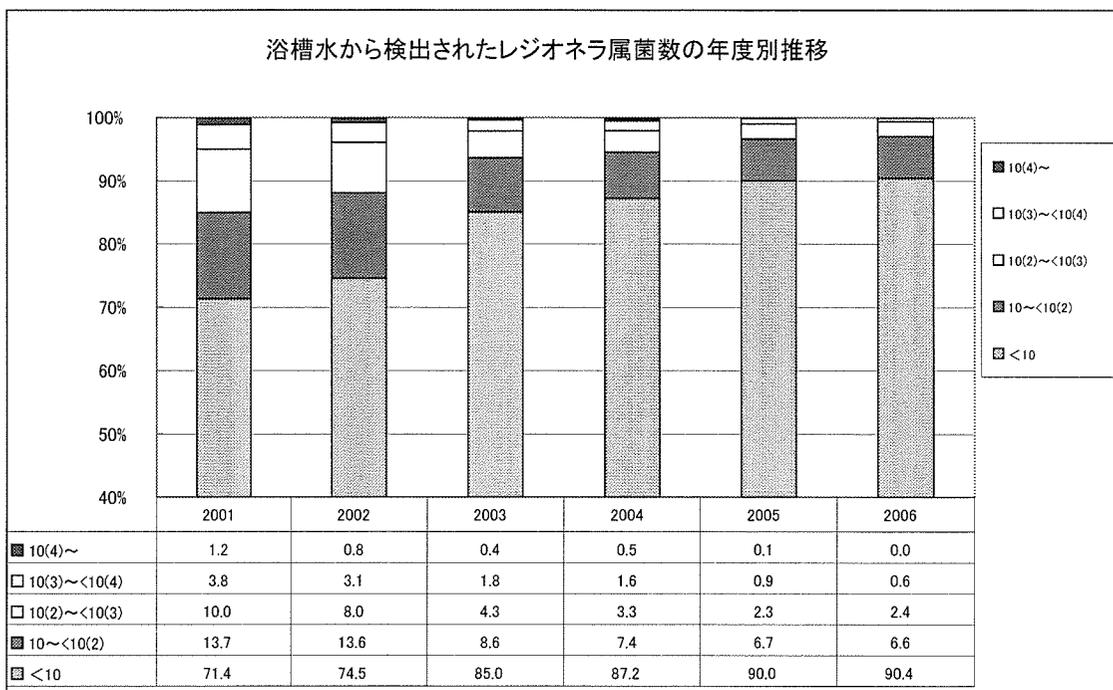
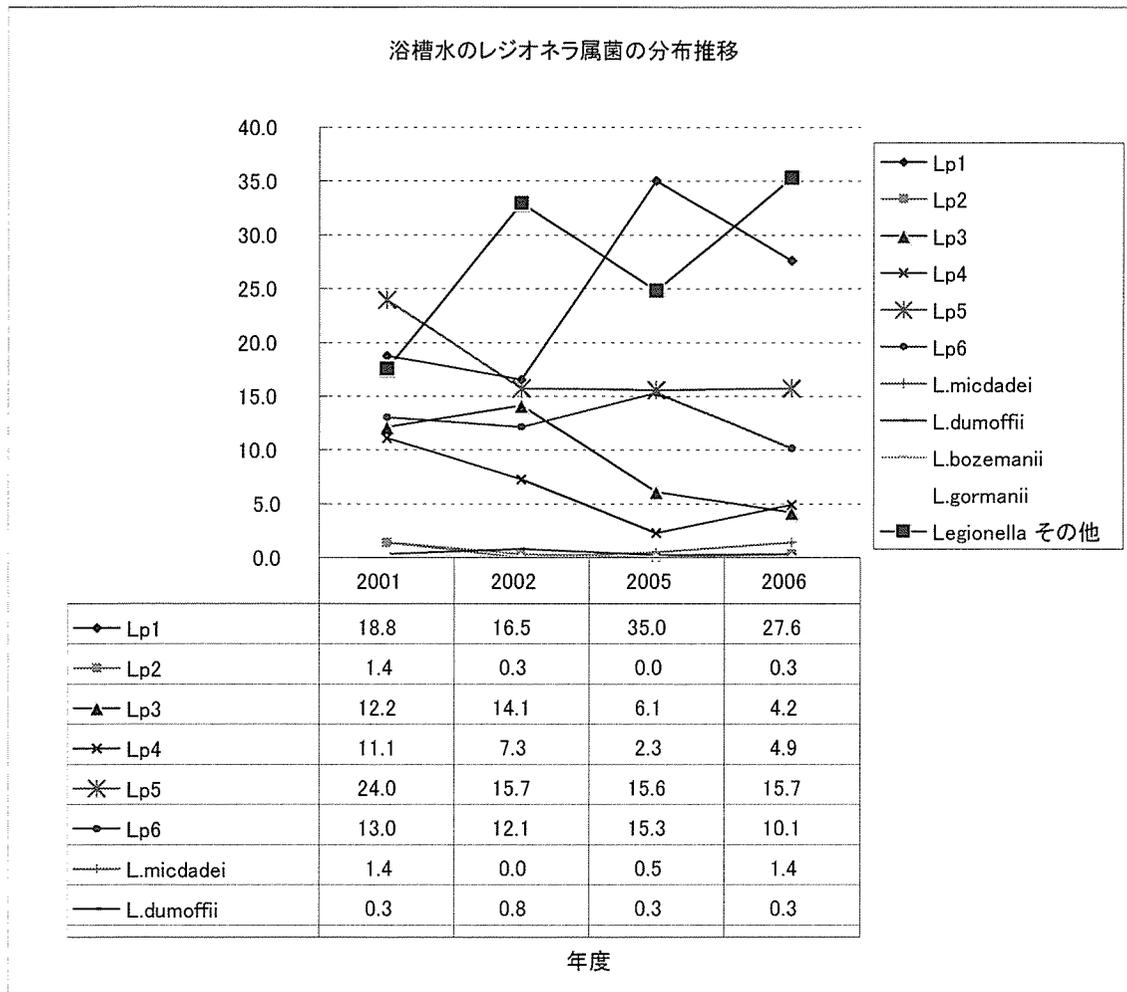


図 3



浴槽水からの抗酸菌の検出状況と検出株の同定

主任研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部
分担研究者 山崎 利雄 国立感染症研究所 ハンセン病研究センター病原微生物部
杉山 寛治 静岡県環境衛生科学研究所
研究協力者 大畑 克彦 静岡県環境衛生科学研究所

概要： 平成16年度～平成18年度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上に、浴槽水中にいかなる抗酸菌が存在するかの調査を行った。183検体中、25検体から抗酸菌43株が検出された。生化学的検査法、DDH法、シーケンス法を行い、検出菌の内訳は、*Mycobacterium gordonae* 8株、*M. scrofulaceum* 1株、*M. avium* 22株、*M. intracellulare* 1株、*M. nonchromogenicum* 1株、*M. fortuitum* 4株、*M. Phlei* 5株、*M. flavescens* 1株と同定された。結核菌(*M. tuberculosis*)は、検出されなかった。

A. 研究目的

結核菌以外の抗酸菌は、自然界に広く分布している。抗酸菌の中には、何らかの原因で細胞性免疫力が低下している人に感染して発病させる抗酸菌が存在するが、健康人にとっては、ほとんどが日和見感染菌である。従って抗酸菌が検出されたからといって即臨床的に問題とはならないが、以前、家庭用の24時間風呂から検出された抗酸菌が原因とされた例も存在するので、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上において、浴槽水中にいかなる抗酸菌が存在するかを明らかにすることは重要である。そこで、循環式浴槽水より抗酸菌の検出を行い、検出された抗酸菌の同定を行い、抗酸菌の汚染状況を調査し適切な衛生管理手法確立のための一助とすることを目的とした。

B. 研究材料と研究方法

1. 菌の分離と増菌培養

平成16年6月～平成18年7月において、関東地方のホテル、旅館、公衆浴場および社会福祉施設等の浴槽水等合計183検体について、抗酸菌およびレジオネラ属菌の汚染状況を調査し、浴槽の形態（①連日使用循環式浴槽 ②毎日完全換水循環式浴槽 ③毎日完全換水式浴槽 ④利用者毎完全換水式浴槽）または浴槽水中の残留塩素濃度との関連を調べた。

抗酸菌の分離培養は、採取された浴槽水200mlを9,000rpm、30分間遠心後の沈渣を、2mlの滅菌精製水に再懸濁した。この懸濁液1mlに等量の4%NaOHを加えて、室温で20分間処理後、このアルカリ処理液0.1mlずつを2～3本の2%小川培地に接種し36±1℃で培養し、コロニーの出現状況を毎週観察した。コロニー陰性の場合には8週間まで培養した。検出された菌を、チール・ネルゼン染色法で抗酸菌である事を確認後、滅菌精製水で微濁浮遊液を10倍希釈系列で希釈し、それぞれの0.1mlずつをMiddlebrook 7H10寒天培地に接種し、5%CO₂フランキ内で36±1℃で2～3週間培養後、単コロニーを釣菌し、1%小川培地にて増菌した。

レジオネラ属菌の検出培養は、検体 400ml を 9,000rpm、30 分間遠心後、上清を捨て、沈渣を滅菌 PBS により懸濁して 100 倍濃縮液を作製した（冷却遠心濃縮法）。そして、濃縮液を 50°C、20 分間加熱処理後、その 100 μ l を GVPC 寒天培地（バイオメリュー）に塗布し、37°C 7 日間、培養した。本菌を疑う集落について、BCYE α 培地（日水）および SCD 寒天培地（栄研）による鑑別培養後、ラテックスキット（オキシイド）を用いてスクリーニングテストを行い、レジオネラ免疫血清（デンカ生研）を用いたスライド凝集反応により、血清群を決定した。

2. 抗酸菌の同定試験

生化学的検査法による同定試験は、極東抗酸菌鑑別セット（極東製薬工業）を用いた。試験操作法、観察判定日、観察判定法は、使用説明書にしたがった。抗酸菌鑑別セット使用による同定試験は、発育速度、集落性状、着色、光発色性試験、p-ニトロ安息香酸（PNB）500 μ g/ml 含有培地上の発育、エタンプトール（EB）5 μ g/ml 含有培地上の発育、ピクリン酸（PA）0.2%含有培地上の発育、p-アミノサリチル酸（PAS）2mg/ml 含有培地の黒変、塩酸ヒドロキシルアミン（HA）500 μ g/ml 含有培地上の発育、硝酸塩還元試験、Tween80 水解試験である。さらに、アリルスルファターゼ試験を追加した。これらの生化学的検査法その他、主な抗酸菌 18 菌種の同定が可能な DNA-DNA ハイブリダイゼーション（DDH）試験キット（極東製薬工業）を用いた。DDH 試験法の操作は、使用説明書に従った。

3. 検出抗酸菌の 16S-rDNA のシークエンス

生化学的検査法や DDH 試験法において、同定不能と判定された菌株、および、同定結果を確認するために、16S-rRNA のシークエンスを行った。すなわち、検出菌 1 白金耳量を TE-緩衝液 100 μ l に懸濁し、100°C30 分間加熱して DNA を抽出し、16S-rRNA を標的としたプライマー 16Ss (5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') と 16Sas (5' TGCACACAGGCCACAAGGGA 3') を用いて 94°C1 分間のプレヒーティングの後、94°C30 秒、60°C30 秒、72°C1 分の条件で 30 サイクルの PCR を行い、PCR プロダクトを High pure PCR product Purification kit（ベーリンガーマンハイム社）を用いて精製後、Dye terminator cycle sequencing 法にて DNA を標識し、スピнкаラム法により未反応の蛍光色素を取り除いた後、ABI310 シークエンサーにてシークエンスを行った。得られた結果を Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDM) あるいは、NCBI の nucleotide-nucleotide BLAST のデータベースと比較して、菌種の決定を行った。

ヒトや実験動物の材料は、含まれていない。また、菌の検出施設は特定できないようデータを整理したので、倫理面の配慮はなされている。

C. 研究結果

1. 抗酸菌とレジオネラ属菌の汚染状況

浴槽水の抗酸菌の汚染状況を表 1 に示す。浴槽水 183 検体中 25 検体（13.7%）から抗酸菌が検出された。また、浴槽水のレジオネラ属の汚染状況を表 2 に示す。浴槽水 183 検体中

27 検体（14.8%）からレジオネラ菌が検出された。

2. 浴槽形態別にみた抗酸菌とレジオネラ属菌の検出状況

浴槽水 183 検体における浴槽形態別の抗酸菌検出状況は、連日使用循環式浴槽において 112 検体中 15 検体（13.4%）、毎日完全換水循環式浴槽において 34 検体中 4 検体（11.7%）、利用者毎完全換水式浴槽において 12 検体中 6 検体（50%）から抗酸菌が検出された。一方、毎日完全換水式浴槽 21 検体、吐出湯 2 検体、貯湯槽 2 検体から抗酸菌は検出されなかった（表 1）。

浴槽水 183 検体における浴槽形態別のレジオネラ属菌出状況は、連日使用循環式浴槽において 112 検体中 13 検体（11.6%）、毎日完全換水循環式浴槽において 34 検体中 2 検体（5.9%）、毎日完全換水式浴槽において 21 検体中 8 検体（38.1%）、利用者毎完全換水式浴槽において 12 検体中 3 検体（25%）、吐出湯 2 検体中 1 検体（50%）からレジオネラ菌が検出された。貯湯槽 2 検体からレジオネラ菌は検出されなかった（表 2）。

3. 浴槽水の残留塩素濃度別の抗酸菌とレジオネラ属菌の検出状況

抗酸菌が検出された浴槽水 25 検体における残留塩素濃度別の抗酸菌の検出状況は、13 検体（52.0%）が残塩 0.2ppm 未満の浴槽水からの検出であり、5 検体（20.0%）が残塩 0.2～0.4ppm の浴槽水から検出された。6 検体（24.0%）が残塩 0.4ppm を超える浴槽水からの検出であった。他 1 検体に関しては残塩濃度未検査または不明であった（表 3）。

レジオネラ属菌が検出された浴槽水 27 検体における残留塩素濃度別のレジオネラ属菌検出状況は、16 検体（59.3）が残塩 0.2ppm 未満の浴槽水からの検出であり、5 検体（18.5%）が残塩 0.2～0.4ppm の浴槽水から検出された。残塩 0.4ppm を超える浴槽水からの検出も 2 検体（7.4）あった。他 4 検体に関しては残塩濃度未検査または不明であった（表 4）。

4. 抗酸菌とレジオネラ属菌検出検体数の相関

浴槽水 183 検体（100%）における抗酸菌とレジオネラ属菌検出検体数の相関は、抗酸菌陽性 25 検体中レジオネラ属菌陽性 6 検体（3.3%）、陰性は 19 検体（10.4%）であった。抗酸菌陰性 158 検体中レジオネラ属菌陽性 21 検体（11.5%）、陰性は 137 検体（74.9%）であった。（表 5）

5. 抗酸菌の同定

浴槽水 183 検体中 25 検体（13.7%）から抗酸菌 43 株が検出され、それぞれ増菌培養後同定試験を行った。抗酸菌 43 株全てが光発色性を持たず、PNB 培地に増殖したため、結核菌群（*M. tuberculosis complex*）を否定した。この抗酸菌 43 株の生化学的検査法、DDH 法、16S-rRNA を標的とした PCR 産物の DNA シークエンス法により菌種同定を行い、その結果の内訳を表 6 に示した。*Mycobacterium gordonae* 8 株、*M. scrofulaceum* 1 株、*M. avium* 22 株、*M. intracellulare* 1 株、*M. nonchromogenicum* 1 株、*M. fortuitum* 4 株、*M. phlei* 5 株、*M. flavescens* 1 株であった。

D. 考察

抗酸菌は、脂質に富む細胞壁を持つため染色されにくい、一度染色されると酸・アルコールに抵抗性で脱色されにくい（抗酸性）性質を有するため、抗酸菌と呼ばれる。チール・ネルゼン染色法では、赤い棍棒状に染色される。グラム陽性・好気性・非運動性・多形態性の桿菌である。抗酸菌は、ヒトに対して病原性のあるものから、非病原性のものまでおよそ60種が知られている。抗酸菌のなかで結核菌群 (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*) 以外の培養可能な抗酸菌を一括して非結核性抗酸菌 (nontuberculous mycobacteria:NTM) と呼び、自然界に広く分布している。また、それによる感染症は、非結核性抗酸菌症と呼ばれている。

*M. tuberculosis*による新規登録の全結核患者数は、平成17年度には28,319人で罹患率（人口10万対）は22.2であった。また、結核死亡者数は、2,295人であり、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、結核菌 (*M. tuberculosis*) は、検出されなかった。また、濾材からも結核菌の検出例は1例もなかったことから、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、調査がなされていないため不明である。日本結核病学会の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%の比率で非結核性抗酸菌症が発生していた。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。今回の調査でヒトに病原性が報告されている菌種は、*M. gordonae* 8株、*M. scrofulaceum* 1株、*M. avium* 22株、*M. intracellulare* 1株、*M. nonchromogenicum* 1株、*M. fortuitum* 4株が検出されている。また、平成18年度の調査では、本調査の対象外ではあるが、循環式浴槽の濾材から、*M. gordonae* 1株、*M. avium* 4株、*M. goodii* 9株が検出された。非結核性抗酸菌は、自然界に広く分布しているが、健常人にとっては、ほとんどが日和見感染菌である。したがって、菌が検出されたからといって、即病気を起こす原因とは言い切れない。しかし、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ているので、これらの菌が、非結核性抗酸菌症を引き起こす可能性は否定できない。今回の調査では、循環配管やろ過器をもつ浴槽から、浴槽水183検体中抗酸菌が25検体（13.7%）検出され、同じお湯の長期使用、部分的な死に水の存在、有機物の蓄積などがある浴槽の形態が抗酸菌の増殖を招いている可能性が示唆された。一方、いわゆる掛け流し式である毎日完全換水式浴槽からの抗酸菌検出は21検体中全く認められなかった。これは、毎日完全換水式形態の浴槽は病原微生物増殖の温床となりうる濾過装置や、バイオフィームが形成されやすい循環式の配管構造を持たず、さらに毎日の換水により有機物の蓄積を阻止しているためと考えられた。したがって、浴槽内や配管の清掃や消毒、或は、フィルターや濾材のこまめな取り換えなどにより、抗酸菌症の原因となりうる非結核性抗酸菌を排除することは重要であろう。

今回、*M. avium* 症の患者さんから分離した菌と、この患者さんが入浴していた、家庭用

の 24 時間の循環式浴槽の濾材から分離された抗酸菌 3 株を得ている。この 3 株は、生化学的検査法では、MAC であるが、2 株は着色している。しかし、いずれも、DDH 法と 16S-rRNA を標的とした PCR 産物の DNA シークエンスによっても *M. avium* と同定された。現在、濾材より検出された *M. avium* が、患者由来かどうかを、縦列反復数可変領域 (Variable Numbers of Tandem Repeats, VNTR) 型別解析法を行っているところである。

今後は、抗酸菌の殺菌条件等を検討し、現場で使用できる抗酸菌に対する衛生管理法の確立をはかっていく予定である。

E. 結論

健常人にとっては、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。循環式浴槽の浴用水 183 検体中、25 検体から抗酸菌 43 株が分離された。生化学的検査法、DDH 法、シークエンス法により検出菌の同定を行った。分離菌の内訳は、*Mycobacterium gordonae* 8 株、*M. scrofulaceum* 1 株、*M. avium* 22 株、*M. intracellulare* 1 株、*M. nonchromogenicum* 1 株、*M. fortuitum* 4 株、*M. Phlei* 5 株、*M. flavescens* 1 株と同定された。結核菌 (*M. tuberculosis*) は、分離されなかった。また、濾材からは、ヒトに病原性のある *M. avium* 4 株、*M. gordonae* 1 株が同定された。これらの菌種は、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. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1 山崎利雄、入浴施設の浴槽水における抗酸菌の検出、第 81 回日本結核病学会総会、2006、4 月、仙台
- 2) 山崎利雄、東日本地区の温泉浴槽水からの抗酸菌の分離状況、第 35 回 結核・非定型抗酸菌治療研究会、2006、6 月、東京

G. 知的所有権の取得状況

なし

表 1 検体別抗酸菌検出状況 (%)

調査年度	連日使用 循環式浴槽	毎日完全換水 循環式浴槽	毎日完全換水 式浴槽	利用者毎完全 換水式浴槽	吐出湯	貯湯槽	計
16	7/36(19.4)	2/10(20)	0/5(0)	5/9(55.6)	0/0(0)	0/0(0)	14/60(23.3)
17	6/37(16.2)	2/12(16.7)	0/12(0)	1/3(33.3)	0/2(0)	0/2(0)	9/68(13.2)
18	2/39(5.1)	0/12(0)	0/4(0)	0/0(0)	0/0(0)	0/0(0)	2/55(3.6)
計	15/112(13.4)	4/34(11.7)	0/21(0)	6/12(50)	0/2(0)	0/2(0)	25/183(13.7)

表2 検体別レジオネラ属菌検出状況 (%)

調査年度	連日使用 循環式浴槽	毎日完全換水 循環式浴槽	毎日完全換水 式浴槽	利用者毎完全 換水式浴槽	吐出湯	貯湯槽	計
16	4/36(11.1)	1/10 (10)	2/5(40)	3/9(33.3)	0/0(0)	0/0(0)	10/60(16.7)
17	6/37(16.2)	0/12(0)	6/12(50)	0/3(0)	1/2(50)	0/2(0)	13/68(19.1)
18	3/39(7.7)	1/12(8.3)	0/4(0)	0/0(0)	0/0(0)	0/0(0)	4/55(7.3)
計	13/112(11.6)	2/34(5.9)	8/21(38.1)	3/12(25)	1/2(50)	0/2(0)	27/183(14.8)

表3 残留塩素濃度別抗酸菌検出状況 (%)

年度	<0.2ppm	0.2~0.4ppm	0.4ppm<	未検査 又は不明	計
16	6 (42.9)	2 (14.3)	5 (35.7)	1 (7.1)	14 (100)
17	6 (66.6)	3 (33.3)	0(0)	0(0)	9 (100)
18	1 (50)	0 (0)	1 (50)	0 (00)	2 (100)
計	13 (52.0)	5 (20.0)	6 (24.0)	1 (4.0)	25 (100)

表4 残留塩素濃度別レジオネラ属菌検出状況 (%)

年度	<0.2ppm	0.2~0.4ppm	0.4ppm<	未検査 又は不明	計
16	4 (40)	2 (20)	2 (20)	2 (20)	10 (100)
17	8 (61.5)	3 (23.1)	0 (0)	2 (21.5)	13 (100)
18	4 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100)
計	16 (59.3)	5 (18.5)	2 (7.4)	4 (14.8)	27 (100)

表5 抗酸菌とレジオネラ属菌検出検体数の相関 (%)

抗酸菌	レジオネラ属菌		計
	陽性	陰性	
陽性	6 (3.3)	19 (10.4)	25 (13.7)
陰性	21 (11.5)	137 (74.9)	158 (86.3)
計	27 (14.7)	156 (85.3)	183 (100)

表6 浴槽水由来抗酸菌の同定結果

菌種名	株数 (%)
<i>M. gordonae</i>	8 (18.6)
<i>M. scrofulaceum</i>	1 (2.3)
<i>M. avium</i>	22 (51.2)
<i>M. intracellulare</i>	1 (2.3)
<i>M. nonchromogenicum</i>	1 (2.3)
<i>M. fortuitum</i>	4 (9.3)
<i>M. phlei</i>	5 (11.7)
<i>M. flavescens</i>	1 (2.3)
合計	43 (100)

宿主アメーバ内におけるレジオネラ属菌の増殖性ならびに感染性に関する研究

分担研究者	八木田健司	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	倉 文明	国立感染症研究所細菌第一部
	泉山 信司	国立感染症研究所寄生動物部
	下河原理江子	国立感染症研究所寄生動物部

研究要旨： 本研究では、レジオネラ属菌のアメーバ内における増殖性ならびに増殖した菌の感染性に関して検討を行った。代表的な宿主アメーバである *Acanthamoeba* 1細胞内における増殖菌増を定量的に調べた結果、1アメーバ細胞あたりの菌量はおよそ 1,200cfu と算定された。この結果は動物実験で報告された **infectious dose** に近似し、同菌量が宿主アメーバ内に圧縮して存在し得ることが明らかとなり、感染経路の一つとして、レジオネラ感染アメーバ自体が媒体になる可能性が示された。この **infectious dose** の菌量を保持するアメーバを単離し、マウスを用いた感染実験を行った結果からは、感受性のある A/J 系統マウスでは投与後の肺内における菌増殖が確認された。対照試験である BCYE α 増殖菌を用いた場合の感染の結果とほぼ一致しており、感染アメーバ1つの取り込みがマウスにおいては感染成立につながるものと判断された

ボトルを用いた浴槽モデルを開発し、アメーバ放出レジオネラ属菌の温水中における生存性とアメーバに対する感染性を調べたところ、42°Cに保温した滅菌脱塩素水道水中に浮遊した菌は、試験開始直後の菌濃度が4週目には1log程度低下したのに対し、アメーバの感染率を指標とした菌の感染性は試験開始後4日以内に当初の1/5から1/10以下に速やかに低下した。本実験における生存性と感染性の乖離はVNCに関する通説を支持するものとは言えず、むしろ逆の関係を示すものとなったことから、さらに慎重な検討を加えるべく、宿主アメーバに対するレジオネラ属菌の感染性を定量的に解析を行った。アメーバ培養系を用いたマイクロプレートアッセイ法を開発し、50%感染菌量(50% Infectious dose:ID50)を算出することで菌の感染性の変動を定量的に解析した。その結果、BCYE α 培地3日間、30°Cの培養条件でID50が2-3cfuと高い感染性を保持していた菌は、ボトルを用いた浴槽モデル試験において継時的にそのID50が低下を示し、2週間でおよそ58倍に、感染率で見ると98%の低下を示した。浴槽水等の環境においてはレジオネラ属菌のアメーバに対する感染性は、長期に維持されるものではないことが示唆され、レジオネラ感染における“dose-paradox”の解明につながる結果と思われた。

目 的

レジオネラ属菌は環境中において自由生活性アメーバ類を宿主として存在する。ヒトへの同菌の感染は、未だに感染成立に必要な菌量 **infectious dose** が不明であること、感染経路はエアロゾルが一般的とされるが、それ以外の場合も推定され得ること、実際の汚染と感染との間には濃度的な乖離が見られるなど、いわゆる“Dose paradox”という形の問題を抱えている。本研究では、これらの問題の解決を目的として、宿主アメーバに感染したレジオネラ属菌のアメーバ内における増殖性、レジオネラ感染したアメーバの動物への感染性、さらに汚染と感染の関係を明らかにするために環境中に存在するレジオネラ属菌の感染性を定量的に解析した。

方 法

1. アメーバ内における菌の増殖性の解析

1.1 材 料：宿主アメーバとして *Acanthamoeba castellanii* (JAC/E1 株、臨床分離株) を用いた。無菌培養用 PYGC 培地を用い、30°Cにて培養した。実験には栄養体で増殖している状態で使用した。レジオネラ属菌には、*L.pneumophila*/SG1 (冷却塔水分離株) を用いた。BCYE α にて3~4日間、35°Cにて培養したものをを用いた。

1.2 レジオネラ属菌のアメーバ感染：菌濃度がおよそ 0.1OD (約 10^8 /ml) のレジオネラ属菌浮遊液を蒸留水で調整し、4.5ml の新鮮な PYGC 培地中のアメーバに 0.5ml の上記レジオネラ浮遊液を加え 30°Cで培養した。位相差顕微鏡を用いて宿主アメーバの形態変化、アメーバ内における菌の活性化を観察した。

1.3 レジオネラ感染アメーバの単離と菌数測定

感染後、菌が細胞内増殖し活性化し激しく運動していることを確認したアメーバを位相差顕微鏡下でマイクロマニピュレーション法により単離回収した。感染アメーバは 12 穴マイクロプレートウェルに用意した 1ml の蒸留水に移し、アメーバを自然崩壊させ菌の遊出を誘導した。アメーバ崩壊後、無菌的にピペッティングで菌浮遊液を均一に混和した後、BCYE α 培地にて菌数の測定を行った。

2. 感染アメーバのマウス感染試験

2.1 材 料： 宿主アメーバおよびレジオネラ属菌は、「1.1 材料」と同様のものをを用いた。

2.2 レジオネラ属菌のアメーバ感染： 「1.2 レジオネラ属菌のアメーバ感染」と同様にを行った。

2.3 感染アメーバの単離

感染アメーバは顕微鏡下、マイクロマニピュレーションで単離し、1.5ml 微量遠心管に予め入れておいた 40 μ l の生理食塩水に移した。生食内では浸透圧差の影響は小さく、単離後速やかにマウスに投与すれば、アメーバの崩壊は免れる。

2.4 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)、6-8 週齢、オスのみを用いた。感染アメーバを含む生食 40 μ l 全量を経鼻的に麻酔下でマウス投与した。マウスは経時的に安楽殺後剖検し、肺を全摘出しこれをホモジネートし、その一定量を BCYE α 培地で 35°Cにて培養し菌数測定を行った。感染アメーバ投与群では、0 日 (投与直後 30 分)、2 日目、4 日目に各マウス 2 頭ずつ検体採取を行った。対照群として、単離したアメーバのみを投与した群およびレジオネラ菌株 (BCYE α 培地で 30°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。また感染用に調整したアメーバ (5 細胞) について、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。

3. *in vitro* モデル実験によるアメーバ内増殖レジオネラ属菌の感染性試験

3.1 材 料： 宿主アメーバおよびレジオネラ属菌は、「1.1 材料」と同様のものをを用いた。

3.2 試験水の調整

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。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。残留塩素（残塩）濃度を測定し、0.00～0.02mg/Lであることを確認した（HACC 社の測定キット：DPD 比色法）。

3.3 アメーバ内増殖レジオネラ属菌の調整

「1.2 レジオネラ属菌のアメーバ感染」の方法で感染させたアメーバ内で菌が活発に運動すること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。5ml の PYGC 培地で遠心洗浄（500 r p m、5 分間）を 2 回繰り返す、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 25cm² フラスコへ移した。30°C で 1 時間放置し、ほとんどのアメーバが崩壊したところで菌浮遊液を 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。

3.4 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した。メディウムビン内には小型のテフロン製スターラーバーを入れ、試験水を常時攪拌した。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。

3.5 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 μ l 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。

3.6 試験水中の菌のアメーバに対する感染性評価

3 x 10⁵ 個のアメーバをフラスコに接種し栄養体の接着を確認後、PYGC 培地を 2.5ml 残してそこに試験水 2.5ml を加え十分に攪拌し、30°C にて培養した。アメーバへの感染の判断は顕微鏡下で行った。明らかに感染が確認できる 2 日間の培養後にフラスコよりアメーバを剥離、回収した。アメーバ浮遊液は 1 度滅菌 PBS(-) で遠心洗浄（500 r p m、5 分間）して PYGC 培地を除去した後、およそ 200 μ l の PBS (-) でアメーバを再浮遊し、その 10 μ l をスライドグラスに径 1cm 程度に塗り広げ、空気乾燥させた。メタノール固定後、ギムザ染色を行いレジオネラ属菌に感染したアメーバ数を測定した。その際、感染アメーバの判断基準は菌がアメーバ細胞内で数個でも増殖した像を示す場合を陽性とした。なお、アメーバは無作為に約 1,000 個を観察し、感染率を求めた。

4. アメーバに対するレジオネラ属菌の感染性に関する定量的解析

4.1 材料: 宿主アメーバとして *Acanthamoeba* sp. 76-2253 株を用いた。PY 培地で 30°C、3 日間培養し、単層に増殖したものを用いた。レジオネラ属菌は *Legionella pneumophila* 80-045 株（SG 1、臨床分離株）を用いた。同菌株は -80°C 凍結保存材料を BCYE α 培地（DIFCO 製、#218301）に接種後 3 日間、30°C - 35°C にて培養したものを用いた。Page の処方（Page, 1967）に基づきアメーバ用生理食塩水（*Amoeba saline* : AS）を調整し、レジオネラ属菌の濃度調整に用いた。

4.2 ボトル浴槽モデル試験：本研究において開発した方法を利用した。試験には BCYE α 培地で 30°C、3 日間培養したものをを用いた。試験水はオートクレーブ処理した塩素除去滅菌水道水とし、菌液は試験水で 1.0 O.D.に調整したものを 10⁻⁵ O.D.の濃度となるようにボトル内の試験水 200ml に添加し、42°Cで攪拌した。感染性試験には、継時的にボトルより浮遊液の 200 μ l を採取し、これを 1xAS で希釈系列を作製して用いた。

4.3 感染性の定量的解析方法（マイクロプレートアッセイ法）：

1. 菌感染用のアメーバを単層になるまで培養フラスコで培養後、フラスコごと氷水上におき 15 分間ほど冷却した。軽くフラスコ底面を叩くことで培地中にアメーバを剥離、浮遊させた。
2. アメーバ浮遊液を 50ml 遠心管に回収し 500xg で 5 分間遠心した。上清を除去後、10xAS でアメーバを再浮遊し、混和後、再び 500xg で 5 分間遠心した。
3. 上清を除去後、10xAS でアメーバを再浮遊し、一部をとって血球算定盤を用いてアメーバの濃度を測定し、1.0x10⁶ cells/ml となるように 10xAS でアメーバ数を調整した。
4. 48 ウェルマイクロプレート（SMILON 製）を 2 枚養用意し、その各ウェルに 1.0x10⁶ cells/ml のアメーバ浮遊液を 0.5ml ずつ入れ（ウェルあたりのアメーバ数は 5 x 10⁵ cells）、2-3 時間、25°Cで静置しウェル底全面にアメーバを付着、伸展させた。
5. アスピレーター等を用いてウェル内の 10xAS を除去したのち、各希釈系列のレジオネラ属菌試験液を 0.1ml ずつ縦列に 10 個のウェルに加えた（5 ウェル/プレート x 2 プレート）。横列は希釈系列の濃度変化が生ずるようにした（例：右に向かって 1/2、1/4、1/8、...、1 プレート最大 8 系列まで可能）。なお試験に用いた希釈系列の菌液は、菌濃度測定のためにその 0.1ml を BCYE α 培地 3 枚に接種し、35°Cで 4-5 日間培養した。
6. 乾燥を防ぐためマイクロプレートをビニールテープでシールし、35°Cで 1 日間培養後、さらに各ウェルに 0.2ml ずつ 1xAS を加え 3 日間、合計 4 日間培養を継続した。
7. ウェル内でアメーバに感染後、菌が細胞内増殖したことを確認するため、ウェル内をピペティングで穏やかに攪拌し、その 10 μ l を BCYE α に接種し 35°Cで 5-6 日間培養した。
8. 希釈系列の各菌濃度について培養陽性であったウェル数を合計し、培養陽性率を算出した。

本試験ではマイクロプレートアッセイ法により算出された各菌濃度における培養陽性率を、その濃度における菌の感染率と考え、別途測定したウェル内の菌数と感染率との関係から「用量（菌数）－作用（感染率）曲線」を求め、さらにプロビット法を用いて 50%感染菌量（10 ウェル中 5 ウェルにおいて培養陽性となる菌数）を算出した。

結 果：

1. アメーバ内における菌の増殖性の解析

アメーバ細胞内に増殖した菌の数を測定するにあたっては、浸透圧差を利用してアメーバを自然破壊に導く方法を用いた（図-1）。アメーバ 1 細胞からの検出菌数は、150～

4,500cfu/Am とアメーバによる差が見られたが、全体としてアメーバの径が 15-25 μ m の場合で菌数は 1,000 cfu/Am 前後に分布し、平均菌数としては 1,195 cfu と算出された (図-2)。培養条件を変えて同一アメーバからの菌の増殖性を調べたが、pH、温度、培地サプリメント濃度による差は見られなかった。また培地メーカーの製品についてアメーバ由来の菌の増殖性を比較したが、DIFCO 製と比較して OXOID 製はやや増殖性が良い傾向が見られたのに対し、栄研化学社製は極端に増殖性が低いことが確認された。

2. 感染アメーバのマウス感染試験

図-3 に実験マウス群による検出菌数の経時変化を示した。感染アメーバの投与群 (以下感染アメーバ群と略す) では、感受性の A/J マウスの菌数は 0 日から 2 日目の間に 0.82 log の増加、そして 2 日目から 4 日目までの間に 1.81 log の減少を示し、投与後の肺内における菌増殖が確認された。一方抵抗性の C57B マウスでは、菌数は 0 日から 2 日目の間で 0.07 log の減少、引き続いて 2 日目から 4 日目の間で 1.13 log の減少を示し、明確な投与後の菌増殖は確認できなかった。この結果は、マウスに対する感染性が確認されている BCYE α 増殖菌群の結果とほぼ一致しており、感染アメーバ 1 つの取り込みがマウス感染成立につながることを示す結果と考えられた。なお感染アメーバ群の対照群としての BCYE α 増殖菌群では、A/J マウスの場合、菌数は 2 日目までに 0.76 log 増加し、その後 2 日目から 4 日目の間に 2.38 log の減少を示し、また C57B マウスでは 1 日目に 0.45 log の若干の増加が見られた以後、1 日から 2 日目の間に 1.05 log 減少し、さらに 2 日目から 4 日目の間に 2.48 log 減少するという菌数変化が見られている。

感染アメーバ群と BCYE α 増殖菌群の間では同一マウス系統で比較した場合、いくつかの点で差異が見られた。A/J マウスでは両群ともに 2 日目の時点でほぼ同様な菌数増加を示すが、その後の菌数は BCYE α 増殖菌群の方が早く低下する傾向を示した。また C57B マウスでは投与後の菌数は両群ともに低下していくが、BCYE α 増殖菌群の方がより早い低下傾向を示した。

3. 塩素除去水道水中のレジオネラ属菌の生存ならびに感染性

浴槽水に近似した条件設定のために本モデル実験は原則として実験温度を 42 $^{\circ}$ C に設定し、また付着が及ぼす菌への生物学的な影響を除外することも考慮し、試験中はスターラーを用いて常時ボトル内の試験水を攪拌した。図 4 に暴露直後の 0 日から約 2 ヶ月間 (8 週間)、生残する菌数ならびにそのアメーバに対する感染率を経時的に調べた結果 (試験数は 4) を示した。0 日における菌数は $1.5 \times 10^5 \sim 5.8 \times 10^5$ cfu/ml であった。菌数は暴露後 3 日目までは大きな変化を示さず、ほぼ初期の数値を維持したが 4 日目以後は低下する傾向を示し、およそ 8 日目では 2log の低下が見られる場合があった。次にこれらの生残した菌のアメーバに対する感染性を調べたところ、暴露直後の感染率は約 30.5%~82% と差があったが、これは初期濃度の違いによるものと推測された。この高い感染率は、しかしながら 2 日目には約 9.1% に急激に低下し、以後暫時低下を続け 4 日目には約 0.1% の低値を示し、8 日目までほぼ 0% の低値を維持した。途中 4 週目に感染率が 6% に上昇した時があったが、これはサンプリン

グが培養3日目になってしまったことからフラスコ内でアメーバから菌が放出され、周囲の未感染アメーバに2次感染を起こしたものと考えられた。基本的にアメーバ内増殖したレジオネラ属菌はアメーバからの放出直後には高い感染性を有しているものの、水中に遊離して存在する間にアメーバへの感染性は低下し、再びその感染性が上昇することは起こりにくいものと考えられた。

4. アメーバに対するレジオネラ属菌の感染性に関する定量的解析

表-1に菌の培養条件を30°Cおよび35°C（培養日数はともに3日間）としたときのID50の算出結果を示した。平均ID50は30°Cの場合 2.5 ± 0.1 cfu、一方、35°Cでは 5.8 ± 0.8 cfuと算出され、両条件とも再現性の良い結果が得られた。両温度条件のID50の差は有意で（ $p < 0.01$ ）、35°C培養の場合、感染性が30°C培養の場合より低下する可能性が示された。

昨年度開発したボトル浴槽モデル系を利用して、塩素除去した水道水中で浮遊培養する菌の感染性を試験した結果を表-2に示した。試験水に浮遊直後（D0）に見られたID50は 2.2 ± 0.1 cfuであり、高い感染性が保持されていることが示されたが、培養1週間後（D7）のID50は35.2 cfu（21.9–48.0 cfu）へと上昇した。2週間後（D14）のID50は127.7 cfu（126.8–128.5 cfu）、3週間後（D21）では245.5 cfu（140.7–351.1 cfu）と上昇を続けた。平均値に基づく浮遊直後のID50に対する比率は、1週間後で16倍、2週間後では58倍、3週間後で112倍と算定され、菌の感染性は、浮遊後1週間でおよそ94%、2週間後ではおよそ98%低下したものと推定された。図5に、21日間の試験期間中における菌数–感染率の関係の変動の一例を示した。各測定時のデータに基づく対数近似曲線を合わせて表示したが、継時的に曲線が右方移動することが明らかであった。

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ている（Harbら2000）。アメーバ内増殖というプロセスがレジオネラ属菌の感染性に影響を及ぼすことは知られているが（Cirilloら1994、Brielandら1996、1997）、本研究ではアメーバ細胞単位でその影響を解析することを目的に、まずアメーバ内で増殖しうる最大菌数を調べた。その結果、アメーバの直径が15-25 μ mの場合でおよそ1000 cfu/アメーバという数値が得られた。この結果は、モルモットに対するエアロゾル感染では2,100 cfuの吸入により血清学的に感染が確認される（Berendtら、1980）という結果とほぼ一致しており、実験的には感染アメーバ1細胞で感染が成立する可能性が示された。

これを検証するために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いて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ものである。