

図1 患者および浴槽水等由来 *L. pneumophila* SG3 株の PFGE パターンと
 デンドログラム解析結果

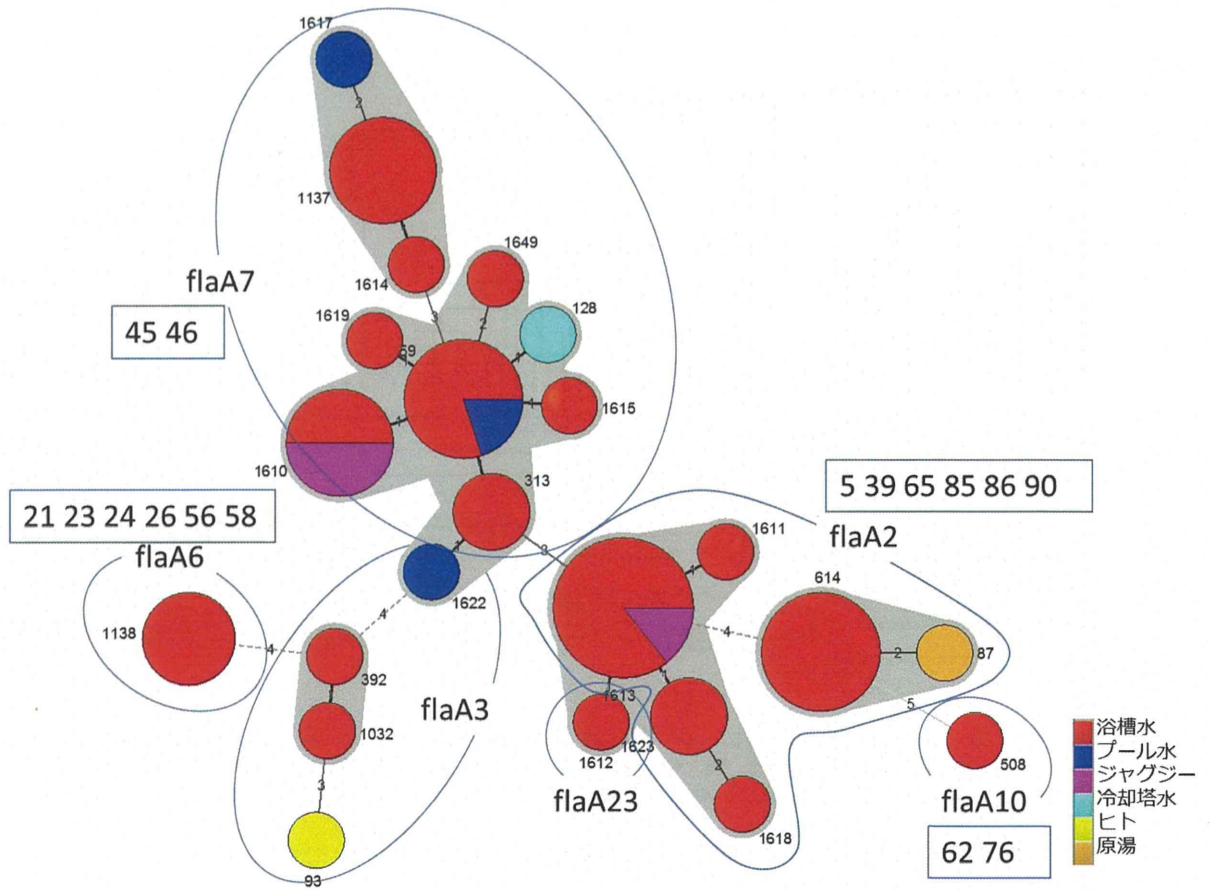
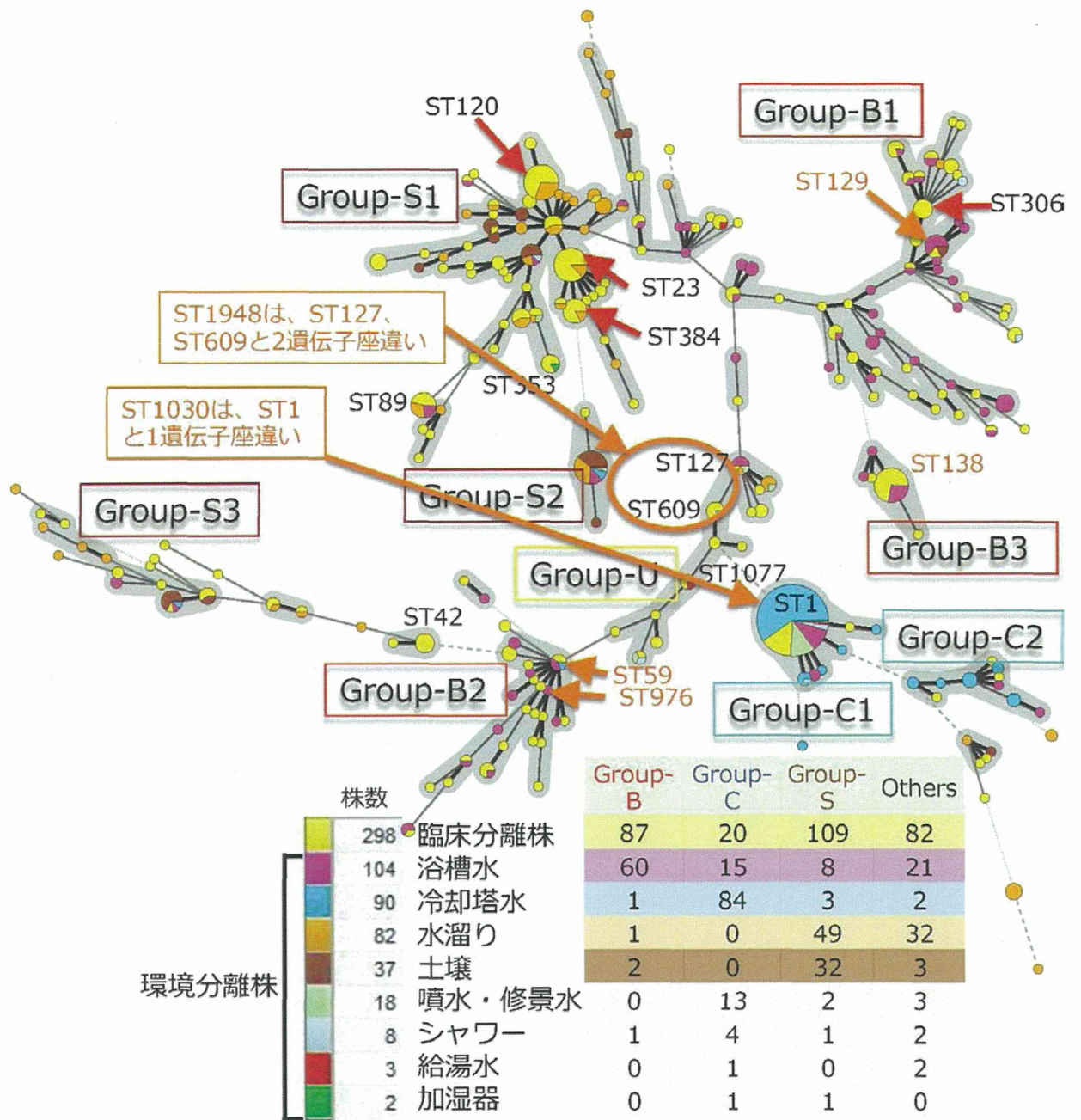


図2 *Legionella pneumophila* SG3 の SBT 法による minimum spanning tree における flaA との関係 (感染研:前川純子先生)

□内の数字は、本年度分離された浴槽水由来株の番号
 円の大きさは菌株数を示す。
 円の中の数字は ST を示す。
 短く太い線は、single locus variant
 薄い実線は、double locus variant
 背景が太い集まりは clonal complex を示し、隣り合う遺伝子座の違いが 2 つ以下の ST の集団を示す。
 線の間の数字は、7 つの locus の内いくつ違うかを示す。



- 遺伝子型別により、国内分離株の血清群1株には、9つの大きな遺伝的グループ (Group-B1, B2, B3, Group-S1, S2, S3, Group-C1, C2, Group-U) が存在した。
- Group-Bに属する臨床分離株(95株)の67%が浴槽水が感染源と推定・確定されており、感染源不明は29%だった。
- Group-Sに属する臨床分離株(116株)の55%が感染源不明で、28%が浴槽水が感染源と推定・確定された。
- Group-Uに属する臨床分離株(21株)、Group-Cに属する臨床分離株(21株)のそれぞれ10%が浴槽水が感染源と推定・確定されており、感染源不明はそれぞれ81%、86%だった。
- 畑仕事などの土壌や、塵埃などが感染源として推定されている患者由来株(20株)の75%がGroup-Sに属していた。

図3 *Legionella pneumophila* SG1(642株)の minimum spanning tree における環境由来 Lp SG1 (6種 ST: オレンジ文字) 9株の予想される位置 (感染研: 前川純子先生)

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金
健康安全・危機管理対策総合研究事業
「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における
衛生管理手法に関する研究」
分担研究報告書

「家庭内環境における *Legionella* 汚染の実態に関する研究」

研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所細菌第一部
○研究分担者	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所微生物部
研究分担者	前川純子	国立感染症研究所細菌第一部
研究分担者	八木田健司	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	渡辺祐子	神奈川県衛生研究所微生物部

研究要旨

家庭内における *Legionella* 感染のリスクを把握し、感染予防対策作成の基礎資料とすることを目的に、昨年度に引き続き家庭内の水環境から *Legionella* 属菌の分離を試みた。協力が得られた 14 軒の家庭から 125 検体（水試料 75 検体、スワブ試料 47 検体、その他（スポンジ）3 検体）を採取し、培養による *Legionella* 属菌の分離と LAMP 法による遺伝子の検出を行った。*Legionella* 属菌は水試料 75 検体中 3 検体（4.0%）およびスポンジ 3 検体中 1 検体（33.3%）から分離されたが、スワブ検体からは検出されなかった。LAMP 法は、直接実施した場合は水試料 75 検体中 24 検体（32.0%）、スワブ試料 47 検体中 6 検体（12.8%）およびスポンジ 3 検体中 1 検体（33.3%）から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出され、アメーバによる増菌後では水試料 75 検体中 31 検体（41.3%）、スワブ試料 47 検体中 6 検体（12.8%）およびスポンジ 3 検体中 2 検体（66.7%）から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された。浴槽の給湯水、洗濯機内水および水槽は LAMP 法による遺伝子検出は 50.0～87.5%と特に陽性率が高く、次いで台所や洗面所、浴室の蛇口水およびシャワー内水は陽性率が 12.5～37.5%であった。*Legionella* 属菌は台所の蛇口水、浴槽の給湯水、水槽およびスポンジから検出され、菌種は *L. pneumophila* SG1、*L. rowbothamii* および *Legionella saintelensis* であった。今回の調査においては平成 25 年度の調査結果を同様に、家庭環境が *Legionella* 属菌により汚染され、*Legionella* 感染リスクが存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

Legionella 属菌は自然環境および人工環境に広く生息していることが知られているが、家庭環境における *Legionella* 属菌の汚染状況に関する調査は限られており、十分なデータが得られていない。そこで、本研究は一般家庭の水環境における *Legionella* 属菌の汚染状況を調査し、家庭内における *Legionella* 感染のリスクを把握して感染予防対策策定に役立つことを目的に実施した。

B. 研究方法

1) 試料の採取

調査に協力が得られた 14 軒の家庭において、平成 26 年 1 月 22 日から 11 月 3 日の期間に調査材料を採取した。試料は水試料およびスワブ試料とし、水試料は 25% チオ硫酸ナトリウム 2.0ml を添加した滅菌容器に原則として 1,000ml を採取した。水道水は放水直後に採取した。水試料は温度を採取時に、pH を実験室に搬入時に測定した。遊離残留塩素濃度は DPD 法によりハンディ水質計“アクアブ”AQ-101 型（柴田科学）を用いて実験室に搬入時に測定した。スワブ試料は、滅菌綿棒で採取部位を拭って採取し、滅菌リン酸緩衝液（pH7.0）を滅菌水で 50 倍に希釈した液 1ml が入った滅菌管に入れた。各試料は冷蔵にて実験室に搬送し、搬入当日に実施する検査まで冷蔵保存した。

2) *Legionella* 属菌の分離

水試料は直径 47mm、孔径 0.2 μ m のポリカーボネートメンブランフィルターでろ過

し、5ml の 50 倍希釈リン酸緩衝液で再浮遊した。滅菌管に入ったスワブ試料はボルテックスにて十分に攪拌後、4ml の滅菌 50 倍希釈リン酸緩衝液を加えて浮遊液とした。試料の浮遊液は 50°C、20 分の加熱処理を行った。処理後の浮遊液を 50 倍希釈リン酸緩衝液で 10 倍希釈し、原液と 10 倍および 100 倍希釈液の各 100 μ l を GVPC α 寒天平板培地 (Oxoid) および WYO α 寒天平板培地 (栄研化学) に塗抹し、36°C で 7 日間培養した。*Legionella* 属菌を疑う集落を BCYE α 寒天平板培地 (Oxoid) に転培し、性状により鑑別を行った。

3) アメーバによる *Legionella* 属菌の増殖

水試料およびスワブ試料の再浮遊試料の加熱処理後の浮遊液 1.0ml を、無菌的に継代培養している *Acanthamoeba castellanii* を浮遊させた 3ml の 50 倍希釈リン酸緩衝液に接種し、25°C で 3~5 日間培養した。培養後、培養液を pH2.2 緩衝液で 4 分間酸処理し、100 μ l ずつを GVPC α 寒天平板培地 (Oxoid) および WYO α 寒天平板培地 (栄研化学) に塗抹し、36°C で 7 日間培養した。*Legionella* 属菌を疑う集落を BCYE α 培地 (Oxoid) に転培し、性状により鑑別を行った。また、LAMP 法により培養液から *Legionella* 属菌の遺伝子の検出を試みた。

4) *Legionella* 属菌の同定

調査試料から分離された *Legionella* 属菌は、LEG (genus *Legionella* 16S rRNA gene) および Lmip (*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene) のプライマーを用いた PCR により *Legionella* 属菌と *L. pneumophila* である

ことを決定した。さらに、型別用血清（デンカ生研）および自発蛍光の有無により種の鑑別を行った。通常の鑑別法により鑑別できない株は、16S rRNA 遺伝子および *mip* 遺伝子のシーケンスにより種を決定した。

5) *Legionella* 属菌遺伝子の検出

LAMP法による *Legionella* 属菌遺伝子の検出は、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E（栄研化学）により行った。水試料およびスワブ試料を 50 倍希釈リン酸緩衝液に浮遊させた試料およびアメーバにより *Legionella* 属菌を増殖させた（アメーバ増菌培養）培養液を対象にして、キット添付の説明書に従って実施した。

L. pneumophila による汚染の有無を確認するために、*L. pneumophila* 特異的 *mip* 遺伝子検出のための PCR を、LAMP 法で陽性となった検体を対象にして実施した。*mip* 遺伝子が検出された検体は、さらに sequence typing を試みた。

6) 従属栄養細菌数

水試料を 50 倍希釈リン酸緩衝液で 10 倍段階希釈し、原液及び各段階の試料の 1.0ml を R2A 寒天培地（BD）に接種し、混釈培養法により 25℃で 7 日間培養した。培養後、集落数を計数した。

7) アメーバの分離

水試料の原液および 50 倍濃縮液の 1.0ml をアメーバ分離用寒天平板に接種し、25℃で 3 日間培養した。プラークを計数するとともに、プラーク部分のアメーバを分離して鑑別を行った。得られたアメーバは栄養

体やシストの形態あるいは鞭毛形成の有無、運動時や水中浮遊時などの形態観察から属を決定した。

8) 家庭環境に関するアンケート

調査の協力が得られた家庭の特性に関するアンケート調査を行った。アンケートの内容は、住居（形態、階数、築年数、居住人数）、水道（受水槽の有無、給湯装置、浄水器の有無）、浴槽（入浴頻度、浴槽水温度、給湯装置、清掃頻度、浴室の窓の有無、清浄剤の使用、配管の清掃、シャワーの使用、シャワーの清掃）、トイレ（温水洗浄便座の使用）、洗濯機（種類、使用年数、使用頻度、残り湯の使用、乾燥機能の使用、洗浄の頻度）とした。

C. 研究結果および考察

家庭環境における *Legionella* 属菌の汚染を調べるために、14 軒の家庭の協力のもとに 125 検体（水試料 75 検体、スワブ試料 47 検体、その他 3 検体）を平成 26 年 1 月 22 日～11 月 3 日に採取した。調査対象試料の内訳および *Legionella* 属菌の分離ならびに LAMP 法の結果を表 1 および表 2 に示した。

Legionella 属菌が分離されたのは水試料 75 検体中 3 検体（4.0%）、スポンジ検体 3 検体中 1 検体（33.3%）であった。このうち、*Legionella* 属菌が分離された水試料 3 検体中 1 検体（台所の蛇口水）はアメーバ増菌培養後に分離された。スワブ試料では、*Legionella* 属菌は分離されなかった。検出された *Legionella* 属菌の内訳は、水試料では、浴槽の給湯水 1 検体から *L.*

pneumophila SG1 (菌数 : 15 CFU/ml)、水槽水 1 検体から *L. sainthelensi* (菌数 : 25 CFU/ml) が検出され、アメーバ増菌後の台所の蛇口水 1 検体から *L. rowbothamii* が検出された。また、スポンジ試料の 1 検体から *L. pneumophila* SG1 が検出された。

Legionella 属菌が分離された蛇口は長期間使用していない蛇口であった。平成 25 年度の調査においても、長期間使用していなかった洗面所の蛇口から *Legionella* 属菌が分離された。水道の蛇口を長期間使用せずに放置すると配管中にバイオフィームが形成され、*Legionella* 属菌が増殖することが推測されることから、*Legionella* 属菌による汚染を防止するために、①蛇口は頻繁に使用する、②水道を長期間使用しない場合には使用開始時に 30 分以上流水するといった対策が必要である。

LAMP 法により *Legionella* 属菌の遺伝子が検出されたのは、直接 LAMP 法により遺伝子検出を試みた試料では、水試料 75 検体中 24 検体 (32.0%)、スワブ試料 47 検体中 6 検体 (12.8%) およびスポンジ試料 3 検体中 1 検体 (33.3%) であった。アメーバ増菌後に LAMP 法で遺伝子検出を試みた試料では、水試料 75 検体中 31 検体 (41.3%)、スワブ試料 47 検体中 6 検体 (12.8%) およびスポンジ試料 3 検体中 2 検体 (66.7%) であった。直接 LAMP 法により遺伝子が検出されなかった 15 試料が、アメーバ増菌後の試料で LAMP 法が陽性となった。このことはアメーバ増菌法により *Legionella* 属菌が増殖し、*Legionella* 属菌の遺伝子が検出感度以上になったことを示しており、アメーバ増菌法の有用性が改めて示された。一方で、直接 LAMP 法で遺伝子が検出された

にもかかわらず、7 試料はアメーバ増菌後の LAMP 法で遺伝子が検出されなかった。この 7 試料は浴槽の給湯水 1 検体、浴槽水 1 検体及び浴室の蛇口のスワブ検体 1 検体及び水槽水 4 検体であった。浴槽水の試料は従属栄養細菌数が 1,175,000CFU/ml と高く、水槽水は従属栄養細菌数を測定していないが、菌数が高いことが考えられる。アメーバ増菌のために試料をアメーバ浮遊液に接種し、培養中に従属栄養細菌が増殖して LAMP 法での *Legionella* 属菌遺伝子検出を阻害したことが推測された。

水試料のうち、54 検体の従属栄養細菌数を測定し、その幾何平均と範囲は 1,071 CFU/ml と <1 (検出限界以下) ~3,415,000 CFU/ml であった。これらの 54 検体のうち 1 検体から *L. pneumophila* SG1 が検出されたが、この試料の従属栄養細菌数は、74 CFU/ml であった。また、54 検体中 20 検体は LAMP 法が陽性であったが、従属栄養細菌数のオーダー別に LAMP 法の陽性率をみると、従属栄養細菌数が 100 CFU/ml 未満では陽性率は 20%前後であったが、100 CFU/ml 以上では 50%前後であった。*Legionella* 属菌は生物膜においてアメーバを宿主として増殖するが、検体中の従属栄養細菌数が高いことは生物膜が生成されていることを示しており、*Legionella* 属菌の汚染対策として生物膜の管理が重要であることを示唆している。

今回の調査において、洗濯機内の水を試料として検査したところ、*Legionella* 属菌は検出されなかったが、直接 LAMP 法により 5 軒の家庭の 5 台の洗濯機から採取した 8 検体中 5 検体 (62.5%)、アメーバ増菌後の LAMP 法により 7 検体 (87.5%) から

Legionella 属菌の遺伝子が検出され、両者の結果を総合すると 5 台すべての洗濯機から遺伝子が検出された。これら 5 家庭の浴槽の給湯水はいずれも *Legionella* 属菌遺伝子が陽性であったが、残り湯を洗濯に活用していたのは 1 軒のみであった。このことは、浴槽から *Legionella* 属菌の汚染が洗濯機に広がるのみならず、洗濯機が単独で *Legionella* 属菌に汚染されやすいことを示唆している。わが国においては、洗濯に使用する水を節約するために浴槽の残り湯を洗濯機のすすぎ水として利用することが一般的に行われている。平成 25 年度の調査においては、調査対象となった 1 軒の家庭で浴槽水、洗濯機の残り湯用ホースおよび水槽水から *L. rowbothamii* が検出され、水の再利用による *Legionella* 属菌の汚染の拡大と定着が示された。今回の調査では、浴槽と洗濯機における *Legionella* 属菌の汚染の関係は明確にならなかった。

協力していただいた 14 軒のうち、*L. pneumophila* SG1 が検出された 1 軒を除く 11 軒から *L. pneumophila* 以外の *Legionella* 属菌あるいはその遺伝子が検出された。こうした *Legionella* 属菌やその遺伝子の存在は、*Legionella* 属菌が生息可能な環境が存在し、*L. pneumophila* による汚染リスクがあることを示唆している。

L. pneumophila 検出用の *mip* 遺伝子をターゲットとした PCR を LAMP 法陽性の検体について実施したところ、3 検体（同一家庭の給湯水と浴室で使用するスポンジおよび別の家庭の浴室の蛇口のスワブ）が陽性となった。この 3 検体を用いて *L. pneumophila* の sequence type を解析したところ、給湯水は型別不能、スポンジは

ST22、浴室の蛇口は ST1966 であった。

今回の調査では、同一の家庭から試料を採取した浴槽の給湯水および浴室で使用するスポンジから *L. pneumophila* SG1 が検出された。この家庭からは、洗濯機および水槽から *Legionella* 属菌は分離できなかったが *Legionella* 属菌の遺伝子が検出されており、当該菌が家庭内において汚染が広がっている可能性が示唆された。*L. pneumophila* SG1 は人のレジオネラ症の主要な原因であり、当該菌が家庭内の水環境に生息していることは、レジオネラ症患者発生の高いリスクが家庭内にも存在していることを示している。過去においては、家庭内の入浴設備を原因とする *L. pneumophila* SG1 によるレジオネラ症が発生しており、家庭においてもレジオネラ対策を行うことが重要であることが改めて示された。

調査において、3 軒の浴室で使用するスポンジを調査したところ、上述の 1 軒に加え、もう 1 軒のスポンジからも遺伝子が検出された。このことから、浴室で使用するスポンジが *Legionella* 属菌の生息場所となり、汚染源となっていることが示唆された。浴室の衛生管理においては、スポンジ等の掃除用具にも留意しなければならない。

平成 25 年度および今回の調査結果で注目されるのは、*Legionella* 属菌の汚染が家庭内における水の再利用により拡大するとともに、家庭内の様々な場所に *Legionella* 属菌が定着していると推測されることである。浴槽での *Legionella* 属菌汚染が一般的に注目されているため、汚染の除去は浴槽を中心に実施されがちであるが、浴槽以外の場所（浴室内であれば蛇口、シャワーへ

ッド、清掃用スポンジ、浴室の床等、浴室外であれば洗濯機と残り湯用ホース、水槽等)にも汚染が存在する可能性がある。したがって、*Legionella* 属菌の汚染対策は、広い範囲において行わなければ、浴槽および浴室のみ対策を講じても、家庭環境内に定着している *Legionella* 属菌による汚染がすぐに浴槽や浴室に及ぶことは容易に想像できる。

6 家庭の鑑賞魚用 18 水槽から採取した 18 検体中 11 検体 (61.1%) が直接 LAMP 法で陽性、13 検体 (72.2%) がアメーバ培養増菌後の LAMP 法で陽性、両者の結果を合わせると 18 検体中 17 検体 (94.4%) から LAMP 法により *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された。また、1 検体 (7.1%) から *Legionella sainthelensi* が分離されたが、この菌が検出された水槽水は海水であった。この調査により、観賞用の水槽を極めて高率に *Legionella* 属菌が汚染していることが明らかとなった。今後、更に詳細に水槽の調査を行う必要があると考えられる。

水試料 75 検体から自由生活性アメーバの検出を試み、4 検体 (5.6%) から分離された。1 軒の家庭の台所の蛇口水から *Hartmannella* 属アメーバが検出された。この蛇口水からは *L. rowbothamii* が検出されており、遊離残留塩素が検出されなかったことから、蛇口あるいは配管中にバイオフィームが形成され、*Legionella* 属菌が増殖していたことが推測された。別の家庭の洗濯機内水からは *Acanthamoeba* 属アメーバが検出された。この試料の従属栄養細菌数は 1.1×10^4 CFU/ml で、LAMP 法で *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された。さらに別の家庭の水槽水からは *Naegleria* 属

アメーバが検出され、この水槽水からも *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された。

各種蛇口水や浴槽水などの検体の提供に協力をいただいた 14 軒のうち 10 軒の家庭に対して、水環境に関するアンケートを実施した。その結果、一戸建て：7 軒 (築年数は 4~55 年)、マンション：2 軒 (同 30 年)、アパート：1 軒 (30 年) で、居住人数は 2~7 人であった。水道はすべて本管直結であった。台所の給湯装置はガス給湯器が 7 軒、貯湯式が 2 軒、不明が 1 軒であった。台所の蛇口に浄水器を設置しているのは 3 軒であった。入浴の頻度は全ての家庭がほぼ毎日入浴しており、浴槽水の温度は 39~42°C で、40°C と 41°C がそれぞれ 4 軒ずつであった。清掃の頻度はほぼ毎日が 5 軒、1 日おきが 1 軒、2~3 日おきが 2 軒、その他が 2 軒であった。浴槽の清浄剤の使用はいずれの家庭もなかった。給湯配管の清掃は 2 軒が年 1 回と回答したが、その他の家庭では回答がなかった。シャワーの使用頻度は毎日は 7 軒、その他が 3 軒であった。シャワーの清掃・消毒は 9 軒が行っておらず、1 軒は無回答であった。トイレの温水洗浄便座を使用しているのは 8 軒であった。洗濯機は全自動が 8 軒、全自動乾燥機付きが 2 軒で使用期間は 3 カ月~11 年であった。使用頻度はほぼ毎日が 4 軒、1 日おきが 1 軒、2~3 日おきが 3 軒、その他が 2 軒であった。残り湯を洗濯に使用しているのは 2 軒であった。洗濯機の洗浄を行うのは 6 軒で、その頻度は月 1 回~年 1 回であった。*Legionella* 属菌あるいはその遺伝子の検出とアンケート結果には明白な関連は見られなかった。

D. 結論

協力が得られた 14 軒の家庭の水環境から 125 検体（水試料 75 検体、スワブ検体 47 検体およびその他の検体 3 検体）を採取し、培養法による *Legionella* 属菌の検出と LAMP 法による *Legionella* 属菌遺伝子の検出を試みた。*Legionella* 属菌は水試料 75 検体中 3 検体（4.2%）、スポンジ検体 3 検体中 1 検体（33.3%）から分離された。スワブ試料では、*Legionella* 属菌は分離されなかった。LAMP 法による *Legionella* 属菌遺伝子の検出では、直接 LAMP 法を実施した場合は水試料 75 検体中 24 検体（32.0%）、スワブ試料 47 検体中 6 検体（12.8%）およびスポンジ 3 検体中 1 検体（33.3%）から遺伝子が検出され、アメーバ増菌後では水試料 75 検体中 31 検体（41.3%）、スワブ試料 47 検体中 6 検体（12.8%）およびスポンジ 3 検体中 2 検体（66.7%）から遺伝子が検出された。試料の種類別では、直接 LAMP 法で浴室給湯水は 10 検体中 5 検体（50.0%）、アメーバ増菌後の LAMP 法では 5 検体（50.0%）、洗濯機内水はそれぞれ 8 検体中 5 検体（62.5%）および 7 検体（87.5%）、鑑賞魚用水槽はそれぞれ 18 検体中 11 検体（61.1%）および 13 検体（72.2%）から遺伝子が検出され、これらの水環境は高率に *Legionella* 属菌により汚染されていることが明らかとなった。さらに、今回の調査では、浴槽の給湯水および浴室で使用するスポンジから *L. pneumophila* SG1 が検出された。平成 25 年度の調査と同様に、今回の調査でも家庭環境において *Legionella* 属菌が生息・汚染しており、水環境によっては高率に汚染していることが明らかとなるとともに、*L. pneumophila* SG1 による汚染

も存在することが示された。このことから、家庭においても水環境におけるレジオネラ汚染に対する対応が必要であることが示された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 家庭環境で採取した水試料の性状と *Legionella* 属菌の汚染状況

試料	家庭数	検体数	温度 (°C)		pH		塩素濃度(ppm)		HPC log ₁₀ (CFU/ml)		培養 陽性	菌数 (CFU/100ml)	LAMP 陽性	アメーバ増菌後		
			平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲	平均 ^a	範囲				培養陽性	LAMP 陽性	
台所 蛇口水	6	8	26.5	24.0-30.0	7.3	7.1-7.4	0.14	0-0.53	2.30	0.30-5.05	0		1(12.5)	1 ^d (12.5)	3(37.5)	
浄水器 蛇口水	2	2	24.4	22.5-26.2	7.1	7.0-7.2	0	0	3.92	3.65-4.20	0		0	0	0	
浴室 蛇口水	8	8	26.0	18.5-36.0	7.3	7.1-7.8	0.19	0-0.45	2.31	0.30-4.01	0		1(12.5)	0	1(12.5)	
浴室 給湯水	9	10	32.5	28.0-39.0	7.4	7.3-7.8	0.12	0-0.50	3.55	1.38-6.25	1 ^b (10.0)	15	5(50.0)	0	5(50.0)	
浴室 浴槽水	3	3	29.8	29.5-30.0	7.3	7.2-7.3	0.15	0-0.45	4.72	1.54-6.53	0		1(33.3)	0	0	
浴室 シャワーホス内水	6	6	26.1	23.0-31.5	7.4	7.1-7.8	0.17	0-0.49	2.78	1.13-5.14	0		0	0	1(16.7)	
洗面台 蛇口水	4	5	25.6	22.0-30.0	7.3	7.2-7.4	0.16	0.02-0.33	1.99	0.60-3.46	0		0	0	1(20.0)	
トイレ ロータク内水	2	2	24.5	22.0-27.0	7.3	7.2-7.4	0.23	0.01-0.44	2.72	1.81-3.62	0		0	0	0	
洗濯機内水	5	8	22.7	16.0-27.0	7.5	7.3-7.9	0.05	0-0.20	3.44	2.18-5.55	0		5(62.5)	0	7(87.5)	
庭 ホス内水	3	5	28.8	21.0-33.0	7.3	7.1-7.5	0.01	0-0.02	4.97	4.23-5.64	0		0	0	0	
水槽	6	18	25.5	23.5-27.0	6.4	3.3-7.6	0	0	—	—	1 ^c (5.6)	25	11(61.1)	0	13(72.2)	
合計		75											2(2.7)	24(32.0)	1(1.3)	31(41.3)

a: 幾何平均、 b: *L. pneumophila* SG1、 c: *L. saintelensi* d: *L. rowbothamii*

表2 家庭環境で採取したスワブ検体等における *Legionella* 属菌の汚染状況

試料	家庭数	検体数	培養	LAMP	アメーバ増菌後		
			陽性	陽性	培養陽性	LAMP 陽性	
スワブ							
台所 蛇口	6	8	0	0	0	0	
浄水器 蛇口	2	2	0	1(50.0)	0	1(50.0)	
風呂 蛇口	8	8	0	1(12.5)	0	0	
風呂 給湯口	9	9	0	4(44.4)	0	5(55.6)	
風呂 シャワーヘッド	3	3	0	0	0	0	
洗面台 蛇口	4	5	0	0	0	0	
ロータンク	3	3	0	0	0	0	
水槽	1	4	0	0	0	0	
庭 ホース	3	5	0	0	0	0	
合計		47	0	6(12.8)	0	6(12.8)	
その他							
スポンジ	2	3	1 ^a (33.3)	1(33.3)	0	2(66.7)	

a: *Legionella pneumophila* SG1 検出

厚労科研(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」
平成 26年度 分担研究報告書

研究分担者 国立感染症研究所 寄生動物部 八木田健司
研究協力者 国立感染症研究所 寄生動物部 泉山信司

レジオネラ感染とアメーバ アメーバのレジオネラ受容体の解析

研究要旨:レジオネラ属菌の宿主アメーバ感染に関与する菌受容体として、糖鎖結合性タンパク質のレクチンおよびその結合糖の存在および作用を解析した。凝集ならびにブロッキング実験では、*Acanthamoeba* に対する ConA の強凝集性以外にレクチンおよびその結合糖の顕著な作用はみられなかった。レジオネラ属菌と *Acanthamoeba* の感染実験系では、ConA に感染促進作用、一方 WGA に感染阻害作用がある可能性が示された。*Acanthamoeba* に存在が知られるマンノース結合レクチンに関しては、菌感染との関係が認められなかった。最も顕著な感染阻害作用が見られたのはアメーバ培養用の PYGC であった。その構成成分である Proteose、Yeast extract およびグルコースは、個々には PYGC に匹敵する感染阻害作用を示さず、PYGC の感染阻害作用の機序は不明であった。

A. 研究目的

環境中に生息する *Acanthamoeba* 等の自由生活性アメーバは、レジオネラ属菌の自然宿主である。最近の研究から、レジオネラ属菌の遺伝子型が、分離される環境によりその分布に違いが見られることが明らかになってきている。一方我々のこれまでの研究からは、菌の遺伝子型グループ(亜種レベル)による宿主アメーバ感受性が異なることが示されており、中でも *Acanthamoeba* はレジオネラ属菌高感受性であった。これらの結果は野外におけるレジオネラ属菌の分布、生態の決定要因に環境中のアメーバ相が関与していることを示唆している。

本研究では菌受容体としての機能をもつことが想定される糖鎖結合性タンパク質のレクチンおよびその結合糖に注目し、菌の感染、感受性の差におけるこれらの因子の関与を解析した

B. 研究方法

1. レジオネラ属菌株

L. pneumophila, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*
L. longbeachae ならびに *L. londiniensis* を用いた。
菌株は BCYE α 培地にて 30°C、3 日間培養し実

験に供した。

2. アメーバ株

A. castellanii ATCC30010 株(AC)ならびに浴槽水より分離した、*Naegleria* sp. (NG)、*Vexillifera* sp. (VX) を用いた。*A. castellanii* ATCC30010 株は PYGC で、NG および VX は大腸菌塗布培地を用いて 30°C で培養した。

3. レクチン凝集反応

市販レクチン試薬(Biotinylated Lectin Kit I&II, Vector Laboratory, USA)を用いた。これらは両キット合わせて 14 種類のレクチン(Con A, SBA, WGA, DBA, UEA1, RCA120, PNA 以上 Kit1、GSL1, PSA, LCA, PHA-E, PHA-L, SJA, Succinylated WDA 以上 KitII)から構成される。

レジオネラ属菌の凝集実験では、レクチン試薬を 200 μ g/ml に PBS で希釈し、マイクロプレートウエル内でその 50 μ l を等量の約 1.0OD に調整したレジオネラ属菌と混和し、30 分間静置した。アメーバの凝集実験では、100 μ g/ml から 2 倍希釈した Con A, WGA, PNA を調整し、AC, NG, VX の PBS 浮遊液と 50 μ l づつスライドガラス上で

1 分間ほどゆっくりと混和し、倒立顕微鏡下で凝集反応を調べた。

4. ドットブロット法によるレクチン反応試験

レジオネラ属菌 5 株の 1.0OD 浮遊液をタンパク定量し、最大濃度 250 μ g/ml から 2 倍希釈系列を作成した。その 1 μ l をニトロセルロース膜にスポットし、風乾後、50 μ g/ml ビオチン標識レクチンで 1 次反応を行い、洗浄、次いで 1,000 倍希釈 HRP 標識アビジン (Bio RAD170-6528) で 2 次反応を行った。洗浄後、DAB 試薬で発色を行った。

5. 糖質による感染阻害試験

PYGC 培養した *A. castellanii* ATCC30010 株を 10xAS で洗浄し浮遊液を調整した。24 ウェルマイクロプレートウェル内に浮遊液を添加、1 時間培養しアメーバをプレートに接着させた。10xAS で 50mM に調整した糖質溶液 (グルコース、ガラクトース、マンノースおよびセロビオース) 200 μ l で置換、30 分間前培養を行った。L.p 80-045 株 (BCYE α 、30°C、2-3 日培養) を 10xAS で浮遊し、0.01O.D. となるようにアメーバのウェルに添加 (20 μ l)、3 時間培養し菌を感染させた。50 μ g/ml となるように gentamycin を添加、培養を継続し、感染 18 時間後にアメーバを含む培養液を回収、遠心 (500rpm \times 3 分間) で浮遊する菌を分離除去した。濃縮されたアメーバ浮遊液をスライドガラスに塗布しギムザ染色を行った。単にアメーバ表面に付着した菌との区別をするために、細胞内で分裂増殖像を示す菌が明確なアメーバを感染細胞として、感染率を求めた。なお細胞はランダムに約 500 個を調べた。

6. レクチン、抗マンノース結合レクチン (MBL) 抗体および PYGC による感染阻害試験

感染前の培養で、10xAS で 10 μ g/ml に調整した Con A, WGA, RCA120 のレクチン、またマンノースに結合性を示すレクチンとして知られるヒトの MBL に対するポリクロナル抗体 (R&D) について、0.1 および 1.0 μ g/ml に調整し、前培養に用いた。それ以外の手順は 5 の糖質による感染阻害試験と同様であった。

PYGC による感染阻害

経験的にアメーバ無菌培地 PYGC ではレジオネラ属菌感染が抑制されることを観察していたことから、PYGC とその構成成分である Proteose peptone (BBL) と Yeast extract (BBL) について前処理を行った。なお、PYGC については原液を、

Proteose peptone と Yeast extract に関しては構成割合である 1% 調整液を用いた。それ以外の手順は 5 の糖質による感染阻害試験と同様であった。

C. 研究結果

レクチン凝集反応

実験に用いた *L. pneumophila*, *L. bozemanii*, ならびに *L. londiniensis* については、14 種類のレクチンによる凝集反応が示されなかった。一方、アメーバに関しては、AC が 5 μ g/ml 以上の ConA に対し明らかな凝集反応を示した (図-1)。対照実験の 10xAS 中でも *Acanthamoeba* には若干の凝集が見られたが、この自然凝集とは凝集の強さが異なった。VX にもわずかな自然凝集がみられたが、50 μ g/ml までの試験レクチンに対する凝集性に違いは見られなかった。NG に関しては自然凝集もなくレクチン反応性は見られなかった。

ドットブロット法によるレクチン反応

ニトロセルロース膜にスポットされたレジオネラ属菌はタンパク質の濃度に依存した反応を示した。どの菌種も 62.3ng まではほぼ同様の反応強度を示したが、より低濃度では菌種による反応性に若干の差が見られた。レクチン WGA では *L. longbeachae* が最も反応が弱い種であった (図-2)。結果としては、全体に菌種による反応性には明確な差は認められなかった。

糖質による感染阻害

単糖類であるグルコース、ガラクトースならびにマンノースは対照実験の 10xAS とほぼ変わらず 80% 以上の高い感染率を示した。二糖類のセロビオースは単糖類よりやや低い感染率を示し、その感染率は対照実験の感染率より約 28% 低下した (図-3)。

レクチンによる感染阻害

調べたレクチンの中で、WGA および RCA120 は対照実験の 10xAS における感染率と比較し、感染率の低下を示した。WGA は RCA120 よりも顕著な阻害作用を示し、10xAS に比して約 30% の感染率低下を示した。一方、ConA は対照実験よりも感染率が 46% 上昇しており、感染促進作用を示した (図-4)。各レクチン実験で感染と同時に非感染条件の培養を行ったが、レクチン存在下でアメーバが衰弱、あるいは死ぬような現象は観察されなかった。

MBLによる感染阻害

調べた濃度では、MBL前処理の感染率は、対照の 10xASの結果と変わらず、高い感染率を示した(図-5)

アメーバ用無菌培地PYGCによる感染阻害

PYGC では感染率は対照の 10xASの約 25%に低下した。一方 Proteose peptone と Yeast extract で個別にアメーバ前培養を行った場合は、感染率の低下が認められなかった(図-6)。

D. 考 察

これまでの *L. pneumophila* と環境中のアメーバの感染実験の結果からは、菌の遺伝子型グループにより宿主アメーバに対する感受性が異なることが示された。この結果は野外におけるレジオネラ属菌の分布、生態の決定要因に環境中のアメーバ相が関与していることを示唆するものであった。本研究ではその感受性を決定する要因は何か、を明らかにする目的でレクチンと糖質の関与を調べた。

レクチンは糖質に結合するタンパク質として一般に知られる。赤血球を凝集させる作用があることで知られた ConA を代表として、現在は植物性あるいは動物性のものが多種類存在する。結合特異性が高いので、細胞表面上の糖鎖の特定に有効なツールともなる。アメーバでは赤痢アメーバにおいて解析例があるほか、*Acanthamoeba* 等にレクチンの存在が知られている。レクチンの中でもMBLはマンノース結合レクチンとして、微生物受容体等感染にも関連性が高い分子である。*Acanthamoeba* でもその存在が知られており、角膜への付着因子として病原性に関係している。*Acanthamoeba* はレジオネラ属菌感受性が高いことから、まずこのMBL の菌感染への可能性を考えたが、本研究では特異結合糖であるマンノースが感染を阻害しないこと、またヒトのMBLを認識する点で特異性は低かったかもしれないが、抗MBL抗体も感染を阻害しなかったことから、レジオネラ属菌感染にMBLが関与している証拠は得られなかった。また糖質による顕著な阻害作用がみられなかったことから、アメーバではレクチンが受容体としてレジオネラ属菌感染の主因となる可能性は低い可能性もある。レクチンに関しては、レジオネラ属菌側のレクチンも含め、さらに多糖類の作用とあわせて今後の課題としたい。

一方レクチンを用いた実験では、いくつか興味深い知見が得られた。レクチンの中では ConA のみが *Acanthamoeba* に強い凝集作用を示した。この性質は既に報告はされているが、アメーバ細胞表面に

マンノース、N-アセチルグルコサミン、フコースまたグルコース分子が存在することを示唆している。ConA 作用実験ではレジオネラ属菌の感染は阻害されず、逆に感染を促進する傾向を示した結果は、マクロファージの貪食におけるMBPのオプソニン効果と同様な作用の可能性があり興味深い。

一方、WGA 処理では対照に比べ感染率が約 30%低下した。WGA はN-アセチルグルコサミンを結合糖とし、細菌のペプチドグリカンにも結合性がある。ドットプロット反応の結果ではレジオネラ属菌に反応性を示し、アメーバには凝集性を示さなかった点で菌側に作用するレクチンと考えられるが、菌の凝集性は認められなかった結果との整合性がなく、今後詳細に検討したいレクチンである。

本研究で最も顕著な感染性への影響がみられたのが、アメーバ用培地の PYGC であった。その組成濃度で調べた限りでは、Proteose、Yeast extract およびグルコースは個々に PYGC に匹敵する感染阻害作用を示さず、PYGC の作用機序は不明であった。L-システイン(C)は濃度が 0.75g/L と低く今回は作用を調べなかった。PYGC には多種類の糖質およびペプチド、アミノ酸等が含まれるが、レクチンの作用を調べることで糖質との関連を明らかにすることはできると思われる。

今後は以上の点の解析をさらに進めるとともに、本研究での解析法を利用してレジオネラ属菌の種類による感染性の違いを解明する。

E. 結 論

レクチンとその結合糖を用いて、アメーバのレジオネラ属菌受容体に関する知見を得ることを試みた。方法としては感染阻害試験がレクチンおよび糖質の作用を定量的に評価する上で有用であった。いくつかのレクチンは感染初期の菌とアメーバの接着に影響を与えることが示され、また糖質としては多糖類が接着に影響を及ぼす可能性も示された。またアメーバ培養液である PYGC が有力な手掛りを与えてくれる可能性も示された。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

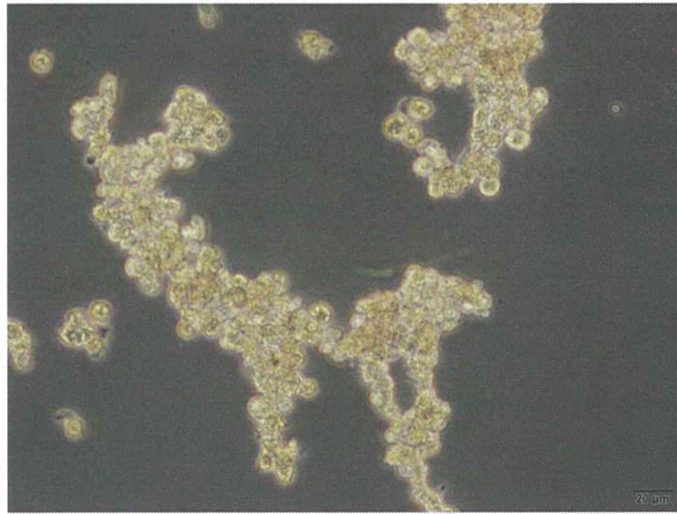


図-1、*Acanthamoeba* のレクチン ConA 凝集反応 (ConA:10 μ g/ml)

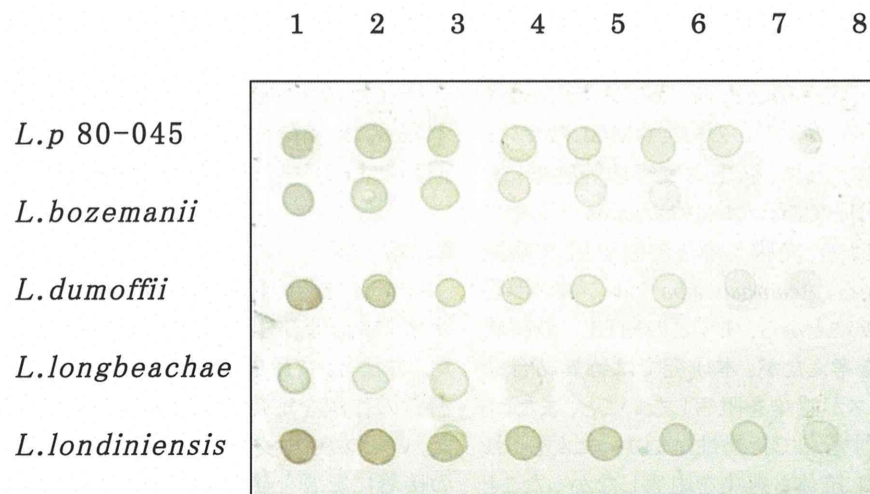


図-2、ドットプロット法によるレジオネラ属菌のレクチン WGA 結合性試験
(メンブレン上数字 1 は 250ng に相当、以下 2 倍希釈系列を示す)

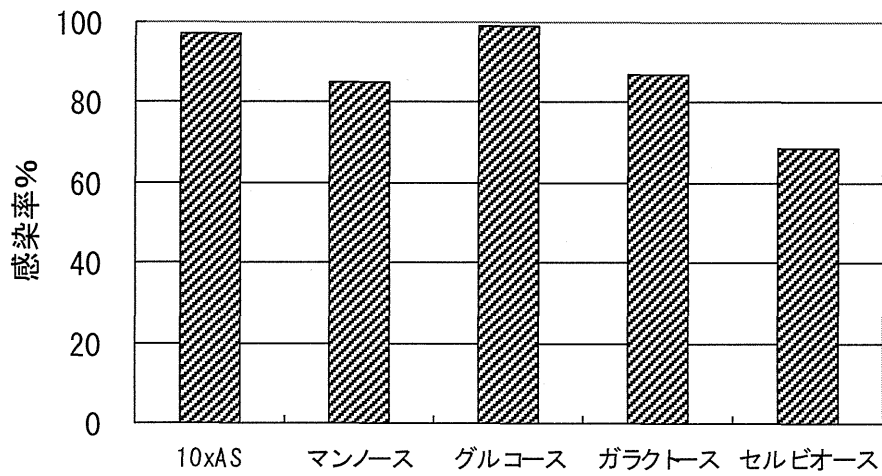


図-3、糖質によるレジオネラ属菌感染阻害試験

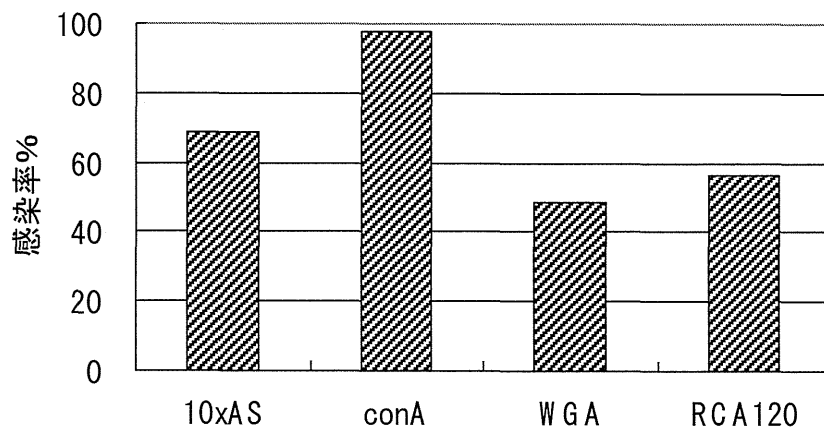


図-4、レクチンによるレジオネラ属菌感染阻害試験

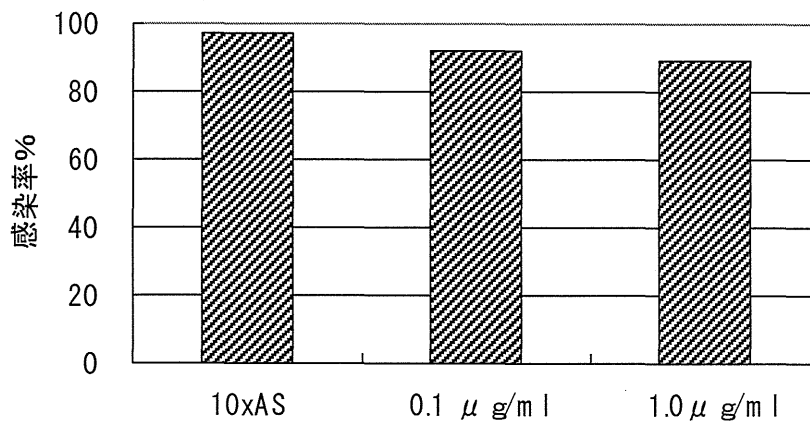


図-5、抗マンノース結合レクチン抗体によるレジオネラ属菌感染阻害試験

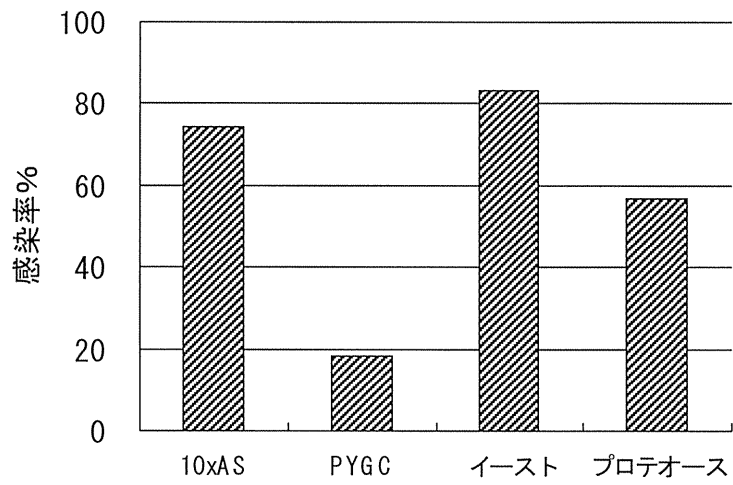


図-6、PYGC とその構成成分によるレジオネラ属菌感染阻害試験

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tomizawa Y, Hoshino Y, Sasaki F, Kurita N, Kawajiri S, Noda K, Hattori N, Amemura-Maekawa J, Kura F, Okuma Y	The diagnostic utility of splenic lesion in a case of Legionnaires' disease due to <i>Legionella pneumophila</i> serogroup 2.	Internal Medicine			in press
Inoue H, Takama T, Yoshizaki M, Agata K	Detection of <i>Legionella</i> species in environmental water by the quantitative PCR method in combination with ethidium monoazide treatment.	Biocontrol Science	20(1)	71-74	2015
Inoue H, Fujimura R, Agata K, Ohta, H.	Molecular characterization of viable <i>Legionella</i> spp. in cooling tower water samples by combined use of ethidium monoazide and PCR.	Microbes and Environments	30(1)	108-112	2015
Nishizuka M, Suzuki H, Ara T, Watanabe M, Morita M, Sato C, Tsuchida F, Seto J, Amemura-Maekawa J, Kura F, Takeda H	A case of pneumonia caused by <i>Legionella pneumophila</i> serogroup 12 and treated successfully with imipenem	Journal of Infection and Chemotherapy	20(6)	390-393	2014
杉山寛治	モノクロラミン消毒による浴槽水の衛生対策	ビルと環境	No. 148	34-41	2015
倉 文明	VI. 感染症 22 レジオネラ症	小児疾患診療のための病態生理	46増刊号	907-911	2014