

ネラ DNA が検出され、浴槽壁からレジオネラ属菌が検出されたことから、浴槽壁でレジオネラ属菌が増殖し、洗浄が不十分であるために生物膜やレジオネラ属菌が残っていると推測された。

施設 C では、水試料からはレジオネラ DNA が 2 検体 (20.0%) から検出されたのみであった (表 1)。この施設は週のうち利用日のみ浴槽に湯を張り、当日限りで使用して清掃しているために、レジオネラ DNA が検出されただけでレジオネラ属菌は検出されず、レジオネラ属菌の汚染は非常に少なかった。

今回の調査の対象とした入浴施設は、特に施設 A 及び B ではレジオネラ DNA 及びレジオネラ属菌が検出されたが、いずれも管理の徹底によりレジオネラ属菌の汚染を防ぐことが可能と考えられる。浴槽壁のブラシによる洗浄 (ブラッシング) と塩素による消毒や蛇口やシャワーの流水 (flushing) 及び定期的な消毒といった汚染対策のための管理の徹底が必要である。

## 2) 医療機関

神奈川県内の 3 か所の医療機関 (D、E、F) において調査を実施した。医療機関での試料の採取は平成 27 年 10 月 26 日から平成 27 年 11 月 18 日に行った。調査の対象とした医療機関は 200 床以上を有し、主要診療科を設置している。

医療機関 F では浴室の湯口水、蛇口水、シャワー水、病室・ナースステーション・給湯室・共用場所・談話室・中央監視室の洗面台の蛇口水、貯水槽の蛇口水を 15 検体採取し、温度は平均 30.4℃、範囲は 19.8～42.4℃、pH は平均 7.4、範囲は 7.3～7.6、残留塩素濃度は平均 0.23mg/L、範囲は 0.14～0.56mg/L、ATP は幾何平均 1.8RLU、範

囲は 0～8RLU、従属栄養細菌数は幾何平均 64.7CFU/ml、範囲は検出限界以下～3,005CFU/ml であった。

医療機関 E では浴室の湯口水、蛇口水、シャワー水、病室・ナースステーション・共用場所・談話室の洗面台の蛇口水、受水槽の蛇口水を 16 検体採取し、温度は平均 29.6℃、範囲は 18.1～33.8℃、pH は平均 7.5、範囲は 7.4～7.6、遊離残留塩素濃度は平均 0.09mg/L、範囲は 0.01～0.54mg/L、ATP は幾何平均 4.8RLU、範囲は 2～11RLU、従属栄養細菌数は幾何平均 1,095CFU/ml、範囲は 6.0～49,500CFU/ml であった。

医療機関 D では浴室の湯口水、蛇口水、シャワー水、病室・ナースステーション・共用場所・談話室の洗面台の蛇口水、受水槽の蛇口水を 15 検体採取し、温度は平均 28.4℃、範囲は 18.0～38.7℃、pH は平均 7.8、範囲は 7.7～7.8、遊離残留塩素濃度は平均 0.05mg/L、範囲は 0.01～0.11mg/L、ATP は幾何平均 3.8RLU、範囲は 0～32RLU、従属栄養細菌数は幾何平均 170CFU/ml、範囲は 1.0～9,250CFU/ml であった。

医療機関 D では、水試料 15 検体中 9 検体 (60.0%) からレジオネラ DNA が検出されたが、スワブ検体 13 検体からは検出されなかった。*L. pneumophila* SG1 及び 5、*L. feeleii*、*Legionella* sp. が、各種蛇口から採取した水試料の 10 検体 (66.7%) 及びスワブ検体 1 検体 (7.7%) から検出された (表 2)。

医療機関 E では、水試料 16 検体中受水槽水 2 検体のうちの 1 検体を除く 15 検体 (93.8%)、スワブ検体 14 検体中 1 検体 (7.1%) からレジオネラ DNA が検出され、*L. pneumophila* SG1 及び *L. feeleii* が各種

蛇口から採取した水試料の 6 検体 (37.5%)  
及び共用場所の洗面台の蛇口のスワブ検体  
2 検体 (14.3%) から検出された (表 2)。

医療機関 F では、水試料 15 検体中 1 検  
体 (6.7%) からレジオネラ DNA が検出さ  
れたが、スワブ検体からは検出されなかつ  
た。*Legionella* sp.が談話室及び病室の蛇口  
から採取した水試料 4 検体 (26.7%) から  
検出された。

今回の調査では 3 か所の医療機関を対象  
にして浴室の浴槽と付随設備、給水系にお  
けるレジオネラ属菌の汚染状況を調べたと  
ころ、医療機関により差があるが、高率に  
レジオネラ属菌、特に *L. pneumophila* に  
汚染されている実態が明らかとなった。医  
療機関 F では他の 2 医療機関と比較して汚  
染率が低率であった。この医療機関の水試  
料の遊離残留塩素濃度の平均は 0.23mg/L、  
範囲は 0.14~0.56mg/L であったが、レジ  
オネラ属菌が検出されたのは遊離残留塩素  
濃度が 0.2mg/L 未満の水試料であった。こ  
れに対して他の 2 医療機関の遊離残留塩素  
濃度は平均と範囲がそれぞれ 0.09mg/L 及  
び 0.05mg/L、0.01~0.54mg/L 及び 0.01~  
0.11mg/L と低かった。この結果から、給水  
系における遊離残留塩素濃度がレジオネラ  
属菌の汚染と関連していることが示唆され  
た。そこで、レジオネラ属菌の汚染を防ぐ  
対策として、医療機関において独自に塩素  
を給水系に添加して遊離残留塩素濃度を  
0.2mg/L 以上にすることを今後検討する必  
要があると考えられる。

#### D. 結論

入浴施設 3 施設の浴槽、湯口、蛇口、シ  
ャワーを対象にレジオネラ属菌による汚染  
状況を調査したところ、浴槽水、浴槽壁、  
湯口水、蛇口水、シャワー水からレジオネ  
ラ DNA 及びレジオネラ属菌が検出された。  
入浴施設のレジオネラ汚染防止には浴槽の  
十分な洗浄・消毒、蛇口やシャワーの消毒  
や流水等による衛生管理が重要であること  
が示唆された。

医療機関の浴室の浴槽、蛇口、シャワー  
並びに給水系のレジオネラ汚染を調査した  
ところ、主として蛇口水からレジオネラ  
DNA 並びにレジオネラ属菌、特に *L.*  
*pneumophila* SG1 及び 5 が検出されたが、  
検出率は機関により異なっていた。その差  
は、給水系の遊離残留塩素濃度が原因であ  
ることが推測され、この結果に基づいて、  
対策として給水系の遊離残留塩素濃度を  
0.2mg/L 以上にすることを検討する必要が  
あるとした。

#### E. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 入浴施設において培養検査結果が陽性となった試料

入浴施設	温度	pH	残留塩素	LAMP	検出菌	菌数 (CFU/100ml)
A 男湯 蛇口 1	39.1	8.0	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG9	530
男湯 蛇口 1 スワブ				+	<i>L. pneumophila</i> SG9	
男湯 蛇口 2	43.2	8.0	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1	110
女湯 蛇口 1	37.4	8.1	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG9	80
女湯 蛇口 2	41.3	8.1	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1	690
女湯 シャワー	24.1	8.2	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1 <i>Legionella</i> sp.	60
B 男湯 浴槽水	39	8.6	1.45	+	<i>L. pneumophila</i> SG6	10
女湯 浴槽壁 スワブ				-	<i>L. pneumophila</i> SG2 <i>L. pneumophila</i> SG6	

表2 医療機関において培養検査結果が陽性となった試料

医療機関	温度	pH	残留塩素	LAMP	検出菌	菌数 (CFU/100ml)
D 病室 1 蛇口	26.9	7.7	<0.1	-	<i>L. pneumophila</i> SG5	20
病室 1 蛇口スワブ				-	<i>Legionella</i> sp.	
病室 2 蛇口	25.3	7.8	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1 <i>L. pneumophila</i> SG5 <i>Legionella</i> sp.	1,670
洗面台 1	26.4	7.8	<0.1	-	<i>L. pneumophila</i> SG5	50
洗面台 2	28.8	7.8	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG5	10
処置室給湯	31.5	7.8	<0.1	+	<i>Legionella</i> sp.	10
浴室蛇口	36.1	7.7	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG5	40
談話室 蛇口	29.2	7.8	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG5	180
手術室 水道	23.5	7.8	<0.1	-	<i>L. feelei</i> SG1	130
手術室 洗浄蛇口	24.7	7.8	<0.1	+	<i>Legionella</i> sp.	3,320
受水槽	18.0	7.8	0.11	+	<i>L. pneumophila</i> SG5	120
E 病棟 廊下 洗面台 1	33.7	7.5	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1	610
病棟 廊下 洗面台 1 蛇口スワブ				+	<i>L. pneumophila</i> SG1	
病棟 廊下 洗面台 2	33.4	7.5	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG5	10
病室 1 蛇口	31.1	7.5	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1	90
病室 2 蛇口	33.4	7.6	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1 <i>L. feelei</i> SG1	1,910
談話室 蛇口	26.7	7.5	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1	3,600
談話室 蛇口 スワブ				-	<i>L. pneumophila</i> SG1	
ステーション	33.6	7.6	<0.1	+	<i>L. pneumophila</i> SG1	3,500
F 談話室 蛇口 1	26.7	7.5	0.15	+	<i>Legionella</i> sp.	430
談話室 蛇口 2	30.9	7.6	0.14	-	<i>Legionella</i> sp.	270
病棟 洗面台	35.3	7.4	0.16	-	<i>Legionella</i> sp.	130
病室 蛇口	28.5	7.4	0.16	-	<i>Legionella</i> sp.	20

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 27 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:

1. レジオネラ属菌の宿主アメーバ感染における受容体の特性を明らかにするために、前年度に続き、菌-アメーバ感染実験系を用いて、糖質およびレクチンの感染抑制あるいは促進効果を定量的に解析した。
2. レクチン ConA とグルコース 2 糖のセルビオースの試験結果からグルコース残基が、またレクチン WGA とヘパリンの試験結果から N アセチルグルコサミン残基が、菌のアメーバ感染初期段階(接着プロセス)に関与していることが示された。
2. WGAとセルビオースに感染抑制効果が、一方 ConA とヘパリンには感染促進効果があり、ヘパリンが感染時存在することで BCYE 培養中に経時低下するレジオネラ属菌の感染性が回復した。
3. 低濃度かつ BCYE での発育能が低下したレジオネラ属菌を、感染促進効果のみられたヘパリンを用いてアメーバで培養することで菌数増幅できることを明らかにし、分離培養困難なフィールド試料からの菌分離の可能性を示した。

A. 研究目的

前年度の研究から、環境中に生息し、レジオネラ属菌の自然宿主となる自由生活性アメーバの *Acanthamoeba* は、レジオネラ属菌感染の初期段階である菌の接着というプロセスにおいて、糖鎖および糖鎖結合性タンパク質のレクチンにより、感染が影響されることを見出した。このことは、菌の感染に糖鎖の関与した受容体が介在し、糖質が感染をコントロールする物質的な要因となることを示している。本年度は、各種の糖鎖およびレクチンにおける菌の感染抑制および促進効果を明らかにするとともに、その促進効果を応用したアメーバによるレジオネラ属菌の増殖法を検討した。

B. 研究方法

1. レジオネラ属菌株

*L. pneumophila* SG1 臨床分離株(80-045 株 Lp と省略)を用いた。菌株は BCYE  $\alpha$  培地にて 30°C で培養し実験に供した。

2. アメーバ株

A. *castellanii* ATCC30010 株(AC と省略)を用

いた。PYGC 培地を用い 30°C で培養した。培地は 2-3 日毎に交換し常に新鮮な栄養体を実験に供した。

3. 糖質およびレクチン

単糖としてペントース(五単糖 C5)のアラビノース、二糖のセルビオース(グルコース 2 分子)、また多糖としてシクロデキストリン(グルコース多糖)、グリコサミノグリカン(糖鎖構造)としてヘパリン(ヘパリン Na)を用いた。レクチンは Con A, WGA ならびに RCA120 (Biotinylated Lectin Kit I&II, Vector Laboratory, USA )を用いた。

4. AC に対する Lp 感染試験

PYGC で培養した AC をプラスチックより剥離し、10 xAS で遠心洗浄を 2 回繰り返し、10xAS で 1x 10<sup>5</sup>/ml に細胞浮遊液を調整した。24 ウェルマイクロプレートウェル内に浮遊液を 0.5ml 入れ、1 時間培養しアメーバをプレートに接着させた。

1) アメーバ前処理条件での感染

アメーバへの糖質あるいはレクチンの影響を見

るために、これらの物質を含むバッファーで前培養を行った。方法は 10xAS で試験濃度に希釈した糖質あるいはレクチン溶液を、アメーバの接着するマイクロプレートの 10xAS を吸引除去後、0.2ml 加え 1 時間 30°C で培養した。その後 10xAS で 0.1OD に希釈した Lp 浮遊液を 20  $\mu$ l 加え静かに混和し菌を感染させた。なお 10xAS を用いた条件を対照実験として行った。

## 2) レジオネラ属菌前処理条件での感染

レジオネラ属菌への糖質あるいはレクチンの影響を見るためには、10xAS で 0.1OD に調整した Lp に糖質あるいはレクチンを試験濃度となるように加え 1 時間 30°C で培養した。アメーバの接着するマイクロプレートの 10xAS を吸引除去後、新たに 10xAS 0.2ml を加え、そこに上述の前処理した Lp 浮遊液 20  $\mu$ l を加え静かに混和した。なお、10xAS を用いた条件を対照実験として行った。

## 3) シアル酸除去試験

糖鎖成分として一般的なシアル酸は、糖鎖とレクチンの結合に阻害的な作用をもつことが知られていることから、レジオネラ属菌のアメーバ感染におけるその影響を調べた。シアル酸除去にはシアリダーゼ(ノイラミニダーゼ, ロッシュ製)を、クエン酸バッファー(10mM, pH5.8)で 0.5U/ml となるように調整し、この中で 0.1OD の菌を 37°C で 30 分間処理した。酵素なしのクエン酸バッファーのみの処理を対照実験とした。遠心洗浄によりバッファーを 10xAS に置換後、先述の 2) レジオネラ属菌前処理条件での感染、と同様にしてアメーバに感染させた。

上記において感染させた菌は 3 時間後に、50  $\mu$ g/ml となるように gentamycin を添加し、未感染のアメーバ外にある菌を不活化した。培養を継続し、感染 18 時間後にプレート底面全体を氷水上につけアメーバを剥離し、アメーバ浮遊液を回収、遠心(500rpm x 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グラスに塗布後、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、その数を測定し感染率を求めた。なお細胞はランダムに約 500 個を調べた。

## 5. アメーバを利用したレジオネラ属菌増殖法

感染実験の準備と同様にして 24 ウェルマイクロ

プレートに AC を接着後させた。10xAS を吸引除去後、10xAS で 10 倍希釈系列で調整した Lp 浮遊液を 0.1ml 加え 25°C で 6 時間培養し、その後 0.2ml の 10xAS を加えて培養を継続。2 日後にカルチャーの一部(50-100  $\mu$ l)を回収し、BCYE  $\alpha$  培地に接種し、感染による菌増殖の有無を確認した。

## C. 研究結果

### レクチンの菌感染に対する効果

前年度の研究でレジオネラ属菌のアメーバ感染に阻害的作用が示唆された WGA は、感染前のアメーバ前処理を行うと 10mg/ml の場合で対照に比べて 10% の感染率低下、50mg/ml の場合は対照の 1% 以下の感染率となり、顕著な感染抑制効果が示された。この前処理によるアメーバへの生物学的影響(運動性、付着性)は特に認められなかった。これに対し、50mg/ml の WGA で Lp を前処理した場合は、感染率は対照と差が見られなかった(図 1)。RCA120 に関しても、WGA とほぼ同様の効果が示された。次に WGA とは対照的にレジオネラ属菌のアメーバ感染に促進的作用が示唆された ConA は、アメーバ凝集作用はみられない 10mg/ml の濃度でアメーバを前処理した場合、菌の感染率は対照と差が見られなかった。これに対し 10mg/ml の濃度で菌を前処理した場合は感染率が対照より 40% が上昇し、顕著な感染促進効果が示された(図 2)。

### 糖質の菌感染に対する効果

単糖であるアラビノースは 100mM でアメーバ前処理の条件で、菌の感染率は対照およそ 60% に低下した。また二糖のセルビオースも、100mM でアメーバ前処理の条件で、菌の感染率は対照のおよそ 50% に低下した。また多糖として調べたシクロデキストリンは 10xAS への溶解性の関係で 20mM で調べたが、菌感染率は対照と差が見られなかった。これらの糖質によるアメーバ前処理では、特にアメーバに対する生物学的影響は認められなかった。一方、糖鎖として巨大分子構造をもつヘパリンは、100U/ml のアメーバ前処理条件で対照より感染率は 30% 上昇し、1000U/ml では約 70% の上昇がみられ、顕著な感染促進効果が示された(図 3)。アメーバに対する生物学的影響は特に見られなかったが、ギムザ染色において細胞が全体に赤色が強くなり、細胞表面に酸性多糖のヘパリンが付着していたことが示された。

### ヘパリンによる菌の感染性回復

レジオネラ属菌は BCYE  $\alpha$  培地での培養により、経過日数とともにアメーバ感染性が低下するが、ヘパリンによる感染性の回復がおきることが示された(図 4)。培養 2 日後の菌は対照である 10xAS において 50%の感染率を示し、そのカルチャーをさらに培養継続し感染性の変化を追ったところ 6 日後の感染率は約 13%、7 日後は 0.8 に低下し、8 日後に 0%となった。この各経過日数において同一のカルチャーを 1000 U/ml で前処理したアメーバに感染させたところ、培養 2 日後の菌の感染率は約 91%に上昇(対照比 1.6 倍)、培養 6 日後では約 48%(対照比 3.7 倍)、培養 7 日後では約 10%(対照比 12.5 倍)の上昇を示し、培養経過とともに低下した菌の感染性が、通常の培養で発育が可能であった 7 日までは感染性が回復しうることが示された。なおすでに感染性が消失していた培養 8 日後のカルチャーには、ヘパリンによる環先生回復が認められなかった。

#### シアル酸除去による菌感染性の変化

ConA ならびにヘパリンに見られた菌の感染性向上の効果から、未処理の(10xAS のみの環境での)菌において感染に阻害的になるような要因が生理的条件下であるのではないかと考えられた。それを菌体表面に存在するシアル酸と想定し、シアル酸除去の効果を調べた。予備的な試験結果ではあるが、対照とするクエン酸バッファーのみで前処理した菌は 10xAS 前処理の場合と同様な感染率を示した一方、シアル酸処理した菌は感染率が約 77%に上昇し、対照比 1.8 倍の感染率を示した。

#### アメーバを増殖装置としたレジオネラ属菌検出

BCYE  $\alpha$  で 3 日間培養した菌は  $10^{-8}$ OD で顕著な増殖を示した。なお、このときの  $10^{-6}$ OD の菌数は約 260cfu/ml であったが、その 1/100 濃度の条件であっても、マイクロプレート内のカルチャーを BCYE  $\alpha$  で培養すると、塗布した部分が一律に白く菌が増殖するほど菌が増殖していた。一方、7 日間培養した菌の場合は  $10^{-6}$ OD の発育菌数は約 80cfu/ml であり、3 日間培養の場合の約 1/3 に減じるとともに、 $10^{-7}$ OD でも接種した菌数と考えられる菌数の発育しか見られず、アメーバ共培養で菌増殖があったとは認められなかった。ただし  $10^{-6}$ OD では明確な感染による菌増殖の結果が示された。一方 7 日間培養の菌の  $10^{-7}$ OD 希釈条件でも、アメーバ感染時に 1000U/ml のヘパリンが存在すると菌の増殖が認められる場合があった(表 1)。アメーバのない条件で培養した場合

は、菌の増殖促進は認められず、ヘパリンによる菌への直接的な増殖促進効果はないものと考えられた。

#### D. 考 察

本研究ではレジオネラ属菌(SG1 に限定)のアメーバ感染率に基づく定量的な解析を行い、1) ConA とセルビオースの試験結果から グルコース Glc 残基が、2) WGA とヘパリンの試験結果から N アセチルグルコサミン GlcNAc 残基が、Lp のアメーバ感染初期に関与していること、さらに 3) ConA とヘパリンには菌の感染を促進する効果があること、が示された。Guc 残基や GlcNAc 残基は様々な細胞表面には一般的ではあるが、これらがアメーバにおけるレジオネラ属菌感染の受容体分子の一端を担っていることが、本研究により明確になった。また受容体反応においては阻害的效果が見られるのが一般的と考えられるが、ConA やヘパリンなどが促進的效果を示したことは、これまで報告はみられず極めて興味深い結果となった。

その機序については不明だが、レクチンにはオプソニン効果として病原体の貪食能を向上させる効果があることが知られ、ConA にはそのような効果がある可能性がある。この点は臨床的にみると重要であり、ヒト体内にレジオネラ属菌のマクロファージ等への取り込みを促進させるような物質が存在するかもしれないことを意味する。実際に肺胞での結核菌取り込みにこのようなメカニズムが働いていることが最近知られている。一方ヘパリンにも受容体反応を保護、促進させる作用があると言われているが、今回の研究からは恐らくヘパリンはアメーバ側に作用し、アメーバ表面全体がその主要成分である GlcNAc 残基でコーティングされるような形で、菌の接着機会を大幅に増えたことが促進効果の理由ではないかと推察される。GlcNAc を結合糖とする WGA がアメーバ側に作用して感染阻害的に働くことを合わせると、アメーバの GlcNAc 残基が主要な感染受容体分子として働いていることが予想され、少なくとも GlcNAc は感染をコントロールする標的分子として考えることができる。

一方、シアル酸は糖鎖の最先端部に付加され、糖鎖反応を制御すると考えられているものであるが、その酵素学的除去処理が菌の感染性向上に作用したことは、シアル酸で菌側の受容体関与分子が生理的にマスクされていることを示唆している。おそらくは GlcNAc 残基と結合

性を有するタンパク(レクチンの物質)などが菌側にはあるものの、シアル酸でマスクされている可能性が考えられる。菌側の感染性に影響する分子としては、シアル酸も重要な存在ではないかと考えられ、これが培養条件で変化するかどうかなど検証する必要があると思われる。

また本研究では、低濃度でかつ発育性が低下したレジオネラ属菌を含む試料から、アメーバを増殖装置として菌を分離するアメーバ培養法を検討した。BCYE  $\alpha$  培地での発育能力が低下していることが想定される菌において、おそらくは同時にアメーバ感染性が低下するためであろうと考えられるが、単にアメーバと共培養するだけではアメーバの培養装置としての効果は得にくいことが示された。しかし、本研究で感染促進効果が明らかとなったヘパリンを利用することで、菌をより効率的に増幅させる可能性が示され、難培養性とされる菌の検出にアメーバが有用である可能性が示された。今後は培養不能菌 VNC を実験的に作成し、アメーバによるその増殖効果を明らかにすることが必要と考える。

#### E. 結論

レクチンや糖質には、レジオネラ属菌のアメーバ感染に抑制的に働くのみならず、促進的にも作用する場合があるという興味深い事実が明らかと

なった。アメーバ側の受容体としてはNアセチルグルコサミンが糖鎖成分として重要と考えられ、これを標的に感染を制御することが可能と考えられた。またこのNアセチルグルコサミンを主成分とするヘパリンという巨大分子が、菌のアメーバ感染性を高めることを利用し、アメーバを増殖装置とするレジオネラ属菌検出の可能性が示された。今後のフィールド調査に役立つことが期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的所有権の出願・登録状況 なし

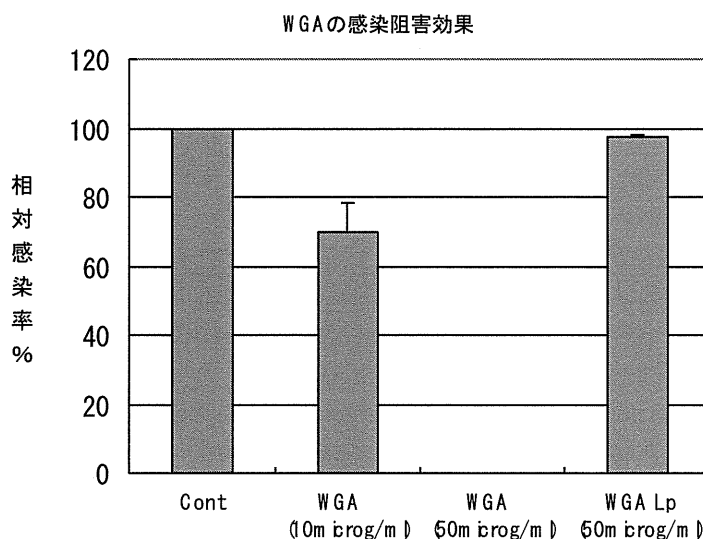


図 1、レクチン WGA の感染阻害効果

Cont は 10xAS を用いた条件、WGA はアメーバを前処理した条件、WGA Lp は菌を前処理した条件

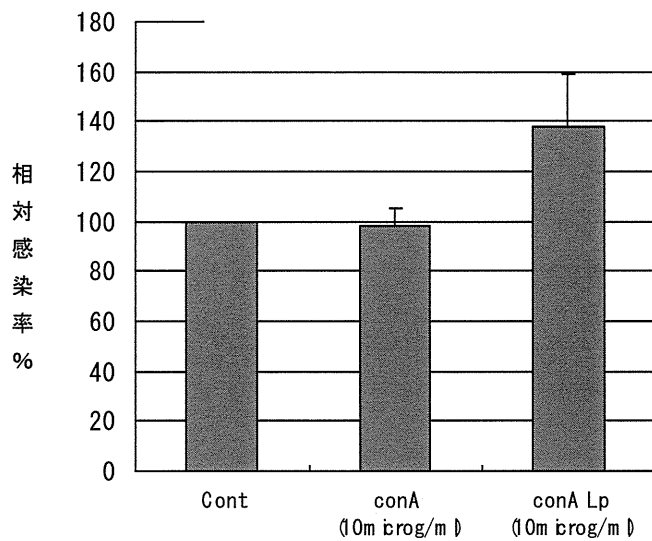


図 2、レクチン ConA の感染促進効果

Cont は 10xAS を用いた条件、ConA はアメーバを前処理した条件、ConA Lp は菌を前処理した条件

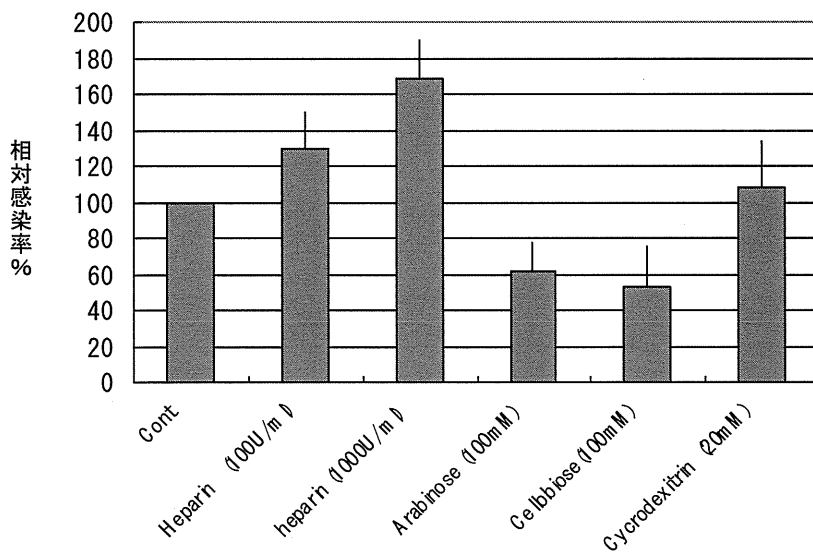


図 3、糖質のアメーバ感染性に対する効果



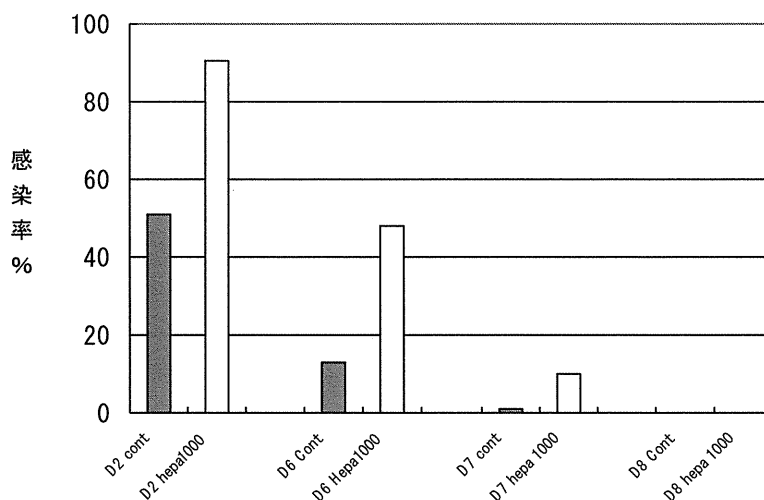


図 4、BCYE  $\alpha$  培養日数の異なる Lp のアメーバ感染に及ぼすヘパリンの影響

表 1、BCYE  $\alpha$  培養 7 日目 (D7) の Lp のアメーバ培養法による検出

希釈系列 10 <sup>-n</sup>	Lp D7 c		Lp D7 +ヘパリン	
	4	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++	+++
6	>500cfu	20cfu	>500c u	>500cfu
7	1cfu	2cfu	69cfu	4cfu

菌とアメーバを 0.3ml で共培養し、2 日後にその 50  $\mu$ l を BCYE 培地で培養し、菌数を測定した。+++は菌数多量。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
中臣昌広		倉 文明 監修	レジオネラ症 対策のてびき 第2版	日本環境 衛生セン ター	神奈川	2015	109

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	Diagnostic utility of splenic lesions in a case of Legionnaires' disease due to <i>Legionella pneumophila</i> serogroup 2.	Internal Medicine	54(23)	3079-3082	2015
吉崎美和	PCRによる選択的検出法を用いた迅速検出	防菌防黴	44(5)		印刷中
倉 文明	レジオネラ症の国内外の動向	ビルと環境	No. 149	36-44	2015


#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

ISBN978-4-88893-141-0

C3047 ¥500E

定価 本体500円 + 税

 ブックレット

 ブックレット



# レジオネラ症対策のてびき

中臣昌広・著

倉 文明・監修

一般財団法人 日本環境衛生センター

## はじめに

「レジオネラ症」ということばをご存知でしょうか。感染する機会はどこにでもあり、また、お年寄りや乳幼児、病人など健康弱者と呼ばれる人にとって重篤な結果を招く恐れがある病気のひとつです。

そこで、効果的なレジオネラ症対策を分かりやすく、手にとってすぐ簡単に使いこなせるよう、工夫をしてみました。本書が目指すのは、読者の皆さんがレジオネラ症対策についてより深く理解していただけるようになることであり、そして、日々の衛生管理に役立てていただき、発生源対策を的確に行いレジオネラ症を未然に防止していただくことです。

たとえば、そう、皆さんが保健所の開催する衛生管理講習会に出席して、資料としてこのブックレットを渡されたものと思ってみてください。講師として、環境衛生監視員の私が皆さんの前に立っています。

「さあ、これから私といっしょに勉強していきましょう。レジオネラ症患者を出さないために、どんな衛生管理をすればいいのかをです。けっしてむずかしいことではありません。肩の力をぬいて、一つひとつ知識を身につけていきましょう」

本書の第1章ではレジオネラ症の知識について、第2章では衛生管理の方法について、そして第3章ではレジオネラ症発生や施設における菌検出などについての現場における具体的事例を掲載しました。興味があるところからページを開いていただいてもかまいません。

また、巻末には、もっと詳しく知りたいときに役立つ参考図書、文献、ホームページなどを案内しています。

レジオネラ症患者を出さない。利用者の命を守るためです。そして次に、一生懸命に働く現場の人たちの笑顔をいつも見ていたい。私は、その思いをつよくもって、この本を書くことにしました。

施設等で働く人たちのために、すこしでもわかりやすく、現場ですぐに役立つものになりたいと思いました。この本を皆さんがハンドブックとして活用し、レジオネラ症を防ぐことができれば、私にとって何よりの幸せです。

また、保健所の環境衛生監視員にとっても、この本が手引書になると思っ

ています。その方面でもお役に立てばうれしく思います。

本書が、施設の衛生管理を通じて、レジオネラ症発生防止に役立つことを切に願っています。

中臣 昌広

## 目 次

はじめに

### 第1章 レジオネラ症の知識 ..... 1

1. レジオネラ症とその知識
2. レジオネラ症感染源としての入浴施設
3. レジオネラ症の診断と治療の流れ
4. レジオネラ属菌の検査法
5. レジオネラ症と法整備
6. 意識をもつことが大切

### 第2章 衛生管理の方法 ..... 28

1. リスク管理を知っておこう
2. レジオネラ症発生対策3原則
3. 施設の衛生管理
  - 3-1. 浴槽水・シャワー水の衛生管理
  - 3-2. シャワー、気泡発生装置、ジェット噴射装置、打たせ湯等を設けている場合
  - 3-3. 循環ろ過装置を設けている場合
  - 3-4. 貯湯槽を設けている場合
4. その他の衛生管理
  - 4-1. 高濃度塩素の水でブラッシング
  - 4-2. 配管洗浄
  - 4-3. 原水の井戸に対する水質検査
  - 4-4. 原水槽の清掃
5. 日常点検
  - 5-1. 管理計画の策定
  - 5-2. 作業内容の記録
6. もしレジオネラ属菌が検出されたら
7. もしレジオネラ症患者の発生が疑われたら

第3章 具体的事例	46
<公衆浴場>	53
1. 感染源はこうしてわかる	
2. 薬湯の管理	
3. オーバーフロー水の扱い	
4. 肺炎患者の感染源を推測する	
5. 使用開始時のシャワー水	
6. 事故発生施設が生まれ変わる	
<旅館・ホテル>	74
7. 石の使用	
8. ホテル大浴場の水位計	
9. 旅館業施設の浴槽水から	
<スポーツ施設>	85
10. スポーツ施設の浴室で	
11. プールのジャグジー水槽から菌が	
<介護保険施設>	92
12. 木製風呂の注意点	
13. 介護保険施設の事例	
<その他>	100
14. 免疫の低下がリスクを高める	
エピローグ	104
参考資料一覧	109

## 第1章 レジオネラ症の知識

この章では、レジオネラ症を理解するために欠かすことができない知識を紹介している。順番にこだわらずに読み進めていただいてもかまわない。一度読んだあと忘れてしまったら、何度でも読み返してみしてほしい。

### 1. レジオネラ症とその知識

#### レジオネラ症とは

レジオネラ症は、レジオネラ属菌を原因菌として起こる感染症だ。レジオネラ肺炎とポンティアック熱の二つをさす。

レジオネラ肺炎は、高熱、全身倦怠感、筋肉痛、吐き気、下痢、意識障害などがおもな症状である。症状が重くなれば死に至る可能性がある。潜伏期間は2～10日間である。

ポンティアック熱は、発熱、寒気、頭痛など、インフルエンザに似た症状がみられる。潜伏期間は1～2日間である。一般に軽症のみであり、数日経てば治ることが多い。

レジオネラ症とは	
疫学的特徴	日本では循環式浴槽水からの感染が多く、冷却塔からの感染は少ない。高齢者や入院患者など抵抗力の弱い人に発病しやすく、重症化する。致死率：治療者 7%、無治療者 60～70%
病原体(細菌)	レジオネラ属菌 (50種類以上) 主な菌種：レジオネラ・ニューモフィラ
感染経路	空気感染・飛沫感染 人口水環境(循環式浴槽、冷却塔、給湯設備など)において水の中の菌がしぶき等のエアロゾルとともに飛散、それを吸入することにより感染。ヒトからヒトへの感染はないとされている。その他、汚染水の吸引・誤嚥。
症状	レジオネラ肺炎 ー潜伏期間 2～10日ー 全身倦怠感、筋肉痛、頭痛、高熱、悪寒、乾性咳 → 湿性咳、意識障害、腹痛、おう吐、下痢 ポンティアック熱 ー潜伏期間 1～2日ー 発熱、悪寒、頭痛などのインフルエンザ様症状
行政対応	四類感染症であり、感染症法第12条の規定によりただちに保健所への届出が必要。

(出典：『東京都感染症マニュアル 2009』(東京都福祉保健局健康安全部感染症対策課・編))



## □ CASE REPORT □

## Diagnostic Utility of Splenic Lesions in a Case of Legionnaires' Disease due to *Legionella pneumophila* Serogroup 2

Yuji Tomizawa<sup>1</sup>, Yasunobu Hoshino<sup>2</sup>, Fuyuko Sasaki<sup>2</sup>, Naohide Kurita<sup>2</sup>, Sumihiro Kawajiri<sup>1</sup>, Kazuyuki Noda<sup>1</sup>, Nobutaka Hattori<sup>2</sup>, Junko Amemura-Maekawa<sup>3</sup>, Fumiaki Kura<sup>3</sup> and Yasuyuki Okuma<sup>1</sup>

---

### Abstract

---

We herein report the case of a 49-year-old man with clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenic lesion (MERS) associated with Legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 2. Past reports suggest that Legionella infection is frequent in cases of MERS-associated pneumonia. Obtaining an early diagnosis of legionella infection is a challenge, especially if a *Legionella pneumophila* serogroup other than serogroup 1 contains the causative agent. In this case, the splenic lesion played an important role in recognizing the legionella infection. We suggest that legionella infection should be considered as a differential diagnosis in cases of splenic lesions associated with pneumonia.

**Key words:** Legionella, *Legionella pneumophila* serogroup 2, clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenic lesion, MERS, Legionnaires' disease

(Intern Med 54: 3079-3082, 2015)

(DOI: 10.2169/internalmedicine.54.4872)

---

### Introduction

---

Recently, MRI has revealed that transient splenic lesions may be associated with a group of conditions clinically called mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenic lesion (MERS) (1). We previously reported a case of MERS associated with aseptic meningitis (2). Legionella infection mainly induces pneumonia and sometimes presents with central nervous system manifestations (3, 4). *Legionella pneumophila* comprises over 15 serogroups; infectious disorders caused by serogroup 2 are very rare. We herein report a case of MERS associated with *Legionella pneumophila* serogroup 2 infection and discuss the importance of detecting splenic lesions for acquiring an early diagnosis.

---

### Case Report

---

A 49-year-old man was admitted to Juntendo University Shizuoka Hospital because of a fever and gait difficulty. He had no remarkable past medical or family history. Although he did not have access to the circulating water system, he had a habit of drinking shower water while showering. His body temperature was 39.9°C and his heart rate was 120 bpm. Chest auscultation revealed decreased breath sounds in the left lung. A neurological examination demonstrated a normal mental status with a wide-based gait, fine postural tremors and mildly exaggerated deep tendon reflexes. There were no sensory disturbances or pathological reflexes.

A blood examination showed an elevated white blood cell count (9,900 cells/ $\mu$ L, 89% of which were segmented leukocytes) and levels of aspartate aminotransferase (281 IU/L), alanine aminotransferase (238 IU/L), creatine phosphokinase

---

<sup>1</sup>Department of Neurology, Juntendo University Shizuoka Hospital, Japan, <sup>2</sup>Department of Neurology, Juntendo University, School of Medicine, Japan and <sup>3</sup>Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, Japan

Received for publication January 3, 2015; Accepted for publication March 25, 2015

Correspondence to Dr. Yuji Tomizawa, zawa@juntendo.ac.jp and tmzw1977@gmail.com

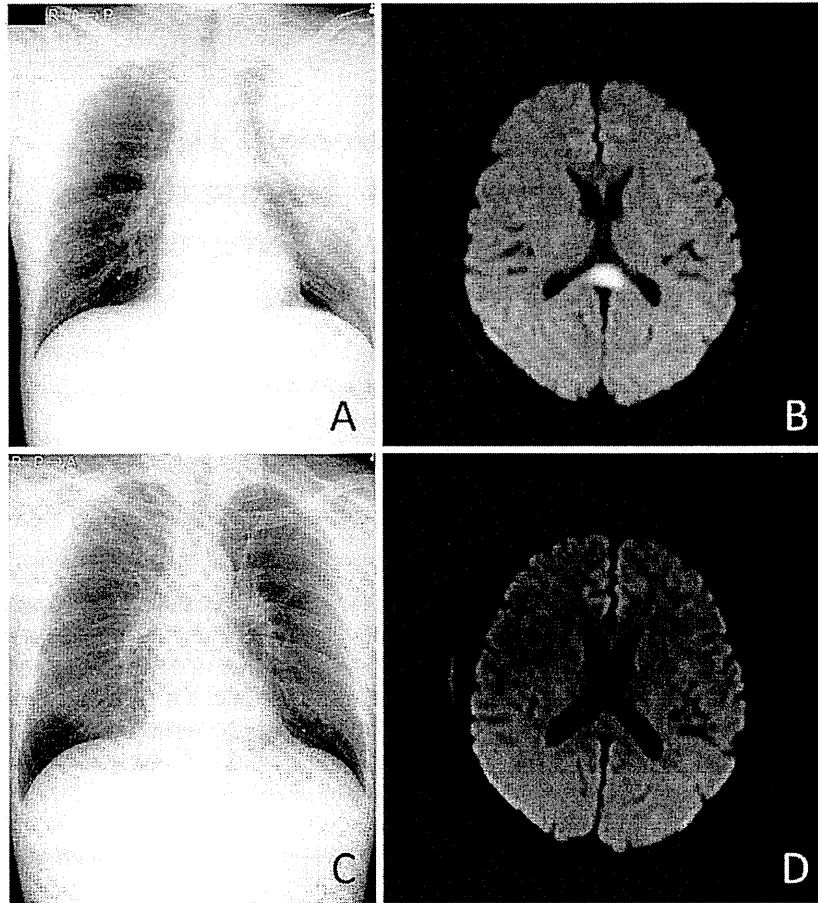


Figure. A. A chest X-ray obtained on admission showed left lobar pneumonia. B. Brain MRI diffusion-weighted image obtained on admission revealed a high-intensity lesion in the middle of the splenium. C. A chest X-ray obtained three weeks after admission showed an improvement in the pneumonia. D. A brain MRI diffusion-weighted image obtained three weeks after admission showed the disappearance of the splenial lesion.

(1,793 IU/L), creatinine (1.31 mg/dL) and C-reactive protein (22.9 mg/dL). The sodium level was slightly reduced (130 mmol/L).

A cerebrospinal fluid (CSF) examination showed a normal white blood cell count (3 cells/ $\mu$ L), normal total protein level (22 mg/dL) and normal IgG index (0.60). There were no oligoclonal IgG bands, and the myelin basic protein level was not elevated, whereas the CSF IL-6 was elevated at 61 pg/mL.

A chest X-ray showed left lobar pneumonia (Figure A), while a brain MRI scan disclosed a splenial lesion (Figure B).

A sputum smear and culture revealed only normal flora of the pharynx. A rapid urinary antigen test for legionella (Alere BinaxNOW<sup>®</sup> Legionella Urinary Antigen Card, Alere, Waltham, USA) was negative, as was an anti-*Mycoplasma pneumoniae* antibody test (particle agglutination).

A diagnosis of community-acquired bacterial pneumonia and MERS associated with pneumonia was made and the administration of sulbactam/ampicillin (6 g/day) was started.

Despite this treatment, the X-ray findings of pneumonia progressed. Therefore, a diagnosis of atypical pneumonia, including legionella infection, was assumed, and the antibiotic was changed to pazufloxacin mesilate (2 g/day). After the administration of pazufloxacin, remarkable radiological and clinical improvements were observed (Figure C). Moreover, the gait disturbance improved completely within a few days, along with an improvement in the pneumonia without specific treatment, and the splenial lesion on MRI disappeared (Figure D).

In order to obtain a further diagnostic evaluation, temporal serum antibody titer measurements in relation to legionella were performed using the microplate agglutination test kit (Denka Seiken, Tokyo, Japan) and in-house heat-killed *Legionella pneumophila* antigens (serogroups 7-15) (5, 6). Titers of each antibody for *L. pneumophila* serogroup 1-15, *Legionella bozemanii*, *Legionella dumoffii*, *Legionella gormanii* and *Legionella micdadei* were <1:16 in the first week. During the second week, the serum titer against *L. pneumophila* serogroup 2 was found to be ele-

vated at 1:32, while that against serogroup 12 was 1:16. In the third and fourth weeks, the titer against *L. pneumophila* serogroup 2 became elevated at 1:64; however, that against serogroup 12 remained at 1:16. Detection of the *Legionella* 16S rRNA gene in the acute-phase serum (in the first week) was negative according to a Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) detection kit (CY240, Takara Bio, Kusatsu, Japan). Although a four-fold rise to  $\geq 128$  in the titer between the acute and convalescent stages is generally required for a definitive serologic diagnosis (7), the clinical picture was consistent with that of Legionnaires' disease, and the four-fold titer increase was reasonable for a diagnosis (8, 9). Therefore, we finally diagnosed the patient as having Legionnaires' disease due to *L. pneumophila* serogroup 2 infection associated with MERS.

## Discussion

Although there are some case reports of MERS associated with *Legionella pneumophila* infection (10-16), no reports of MERS associated with *Legionella pneumophila* serogroup 2 infection have been published to date.

In the present case, the detection of the splenic lesion was one of the most important clues suggesting legionella infection. A urinary antigen test for legionella was negative, as this test detects only *Legionella pneumophila* serogroup 1. There are various reports of MERS associated with pneumonia (10-18); eight of 10 of these patients showed legionella infection, while the others had *Mycoplasma pneumoniae* and/or *Staphylococcus aureus* infection. Given the frequency of legionella infection in pneumonia patients with splenic lesions, the presence of a splenic lesion is thought to have considerable diagnostic value for confirming legionella infection.

The pathophysiology of the splenic lesion in this case was unclear. Intramyelinic edema and inflammatory filtration have been suggested to be mechanisms underlying the formation of splenic lesions (1, 10). The unique anatomical features of the spleen, such as the axonal distribution (19), are believed to underlie the pathophysiology, although histopathological studies are lacking due to the benign prognosis of MERS.

In the present case, the IL-6 level in the CSF was markedly elevated. However, the IL-6 level in the serum was not measured, and we therefore cannot determine whether the IL-6 elevation was caused by influx through the blood-brain barrier or intrathecal production. CSF IL-6 elevation has been reported in previous cases of MERS associated with infection (20-23), and Morichi et al. demonstrated that IL-10 and IFN-gamma elevation in the CSF is more specific for influenza-associated MERS (21). In view of these reports, cytokine elevation after infection is a possible mechanism of MERS development.

It is unlikely that a corpus callosum disturbance mainly causes gait disturbances without inducing prominent symptoms of callosal disconnection. The characteristics of the

gait disturbance noted in the present case included a wide-based gait without a sensory disturbance, thought to be due to a cerebellar disturbance. Cerebellar involvement in cases of legionella infection has been previously reported (3, 4, 24). Interestingly, three of seven cases of MERS associated with legionella were reported to involve cerebellar dysfunction, and Imai et al. demonstrated cerebellar hypoperfusion in a case of MERS associated with legionella infection on SPECT (11).

In conclusion, Legionnaires' disease is a potentially fatal condition, and obtaining an early diagnosis is a challenge, especially if a *Legionella pneumophila* serogroup other than serogroup 1 comprises the causative agent. We herein demonstrated that legionella infection should be considered in cases of pneumonia associated with splenic lesions.

The authors state that they have no Conflict of Interest (COI).

## References

1. Tada H, Takanashi J, Barkovich AJ, et al. Clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenic lesion. *Neurology* 63: 1854-1858, 2004.
2. Tani M, Natori S, Noda K, et al. Isolated reversible splenic lesion in adult meningitis: a case report and review of the literature. *Intern Med* 46: 1597-1600, 2007.
3. Weir AI, Bone I, Kennedy DH. Neurological involvement in legionellosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 45: 603-608, 1982.
4. Johnson JD, Raff MJ, Van Arsdall JA. Neurologic manifestations of Legionnaires' disease. *Medicine (Baltimore)* 63: 303-310, 1984.
5. Tateda K, Murakami H, Ishii Y, Furuya N, Matsumoto T, Yamaguchi K. Evaluation of clinical usefulness of the microplate agglutination test for serological diagnosis of legionella pneumonia. *J Med Microbiol* 47: 325-328, 1998.
6. Nishizuka M, Suzuki H, Ara T, et al. A case of pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 12 and treated successfully with imipenem. *J Infect Chemother* 20: 390-393, 2014.
7. Yabuuchi E, Saito A, Niki Y, et al. Determination of cutoff value of serum anti-*Legionella* antibody titer: Microplate Agglutination Test (MPAT). *Kansenshogaku Zasshi (The Journal of the Japanese Association for Infectious Disease)* 71: 116-124, 1997 (in Japanese, Abstract in English).
8. Maekawa J, Kura F. Diagnostic laboratory tests for legionellosis. *Byogen Biseibutsu Kensyutsu Jouhou (Infections Agents Surveillance Report)* 24: 29, 2003 (in Japanese).
9. Yoshioka H, Takayanagi N, Ishiguro T, et al. Investigation of diagnostic method in 74 *Legionella* pneumonia cases. *Nihon Rinsho Biseibutsugaku Zasshi (The Journal of Japanese Society for Clinical Microbiology)* 22: 28-34, 2012 (in Japanese, Abstract in English).
10. Morgan JC, Cavaliere R, Juel VC. Reversible corpus callosum lesion in legionnaires' disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 651-654, 2004.
11. Imai N, Yagi N, Konishi T, Serizawa M, Kobari M. Legionnaires' disease with hypoperfusion in the cerebellum and frontal lobe on single photon emission computed tomography. *Intern Med* 47: 1263-1266, 2008.
12. Kasai D, Ogasawara T, Tomita Y, et al. A case of Legionnaires' disease with abnormal neurological findings showing the corpus callosum abnormality on brain MRI. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 47: 717-722, 2009 (in Japanese, Abstract in English).
13. Hibino M, Hibi M, Akazawa K, Hikino K, Oe M. A case of Le-

- gionnaires' pneumonia accompanied by clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS) with transient altered mental status and cerebellar symptoms, which responded to treatment by antibiotics and corticosteroid. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 49: 651-657, 2011 (in Japanese, Abstract in English).
14. Kilic EC, Aksoy S, Sahin AR, Uzun N, Gokyigit M. The presentation of a transient hyperintense lesion with Legionnaires disease in a patient: is it a coincidence or an incidental finding? *Idegogyo Sz* 66: 63-66, 2013.
  15. Ohyama K, Kawabata K, Araki A, et al. Reversible splenial lesion associated with infectious disorders: report of seven cases. *Shinkei Chiryō-gaku (Neurological Therapeutics)* 30: 180-184, 2013 (in Japanese, Abstract in English).
  16. Tsunemi Y, Yoritaka A, Hiramatsu M, et al. Two cases of MERS associated with Legionnaires' disease. *Rinsho Hoshasen (Japanese Journal of Clinical Radiology)* 59: 202-209, 2014 (in Japanese).
  17. Hong JM, Joo IS. A case of isolated and transient splenial lesion of the corpus callosum associated with disseminated *Staphylococcus aureus* infection. *J Neurol Sci* 250: 156-158, 2006.
  18. Shibuya H, Osamura K, Hara K, Hisada T. Clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion due to *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Intern Med* 51: 1647-1648, 2012.
  19. Aboitiz F, Scheibel AB, Fisher RS, Zaidel E. Fiber composition of the human corpus callosum. *Brain Res* 598: 143-153, 1992.
  20. Shiihara T, Kato M, Hayasaka K. Clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion. *Neurology* 64: 1487, 2005.
  21. Morichi S, Kawashima H, Ioi H, Yamanaka G, Kashiwagi Y, Hoshika A. High production of interleukin-10 and interferon- $\gamma$  in influenza-associated MERS in the early phase. *Pediatr Int* 54: 536-538, 2012.
  22. Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, et al. Oxidative stress in patients with clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS). *Brain Dev* 34: 124-127, 2012.
  23. Kometani H, Kawatani M, Ohta G, et al. Marked elevation of interleukin-6 in mild encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS) associated with acute focal bacterial nephritis caused by *Enterococcus faecalis*. *Brain Dev* 36: 551-553, 2014.
  24. Shelburne SA, Kielhofner MA, Tiwari PS. Cerebellar involvement in legionellosis. *South Med J* 97: 61-64, 2004.