

属菌が確認できたのは、温泉浴用水38, 冷却塔水7, 給湯水1の計46検体(44.2%)で、菌量は10~14,000cfu/100mlに分布していた。LAMP法での陽性は温泉浴用水41, 冷却塔水12, 給湯水1の計54検体(51.9%)で培養法より8件多い結果であった(Table 3)。培養法で陽性, LAMP法で陰性となったのは9例, 逆に培養法で陰性, LAMP法で陽性となったのは18例あった。

考 察

我々は新しい遺伝子増幅法であるLAMP法による*Legionella*属菌の検出法の開発を行い, 本法が*Legionella*属菌に対して優れた特異性を有し, *L. pneumophila*では60CFU/testまで検出可能と高い感度を有していることを報告した⁶⁾。このLAMP法の評価は, 蛍光インターカレーターを使用しリアルタイムPCR測定装置を用いたが,

Table 3. Detection of legionellae from 104 water samples using the conventional culture method and LAMP method.

No.	Source	Culture (cfu/100ml)	LAMP	No.	Source	Culture (cfu/100ml)	LAMP
1	Hot spring bath	10	-	53	Hot spring bath	10	-
2	Hot spring bath	-	-	54	Hot spring bath	-	-
3	Hot spring bath	10	-	55	Hot spring bath	-	-
4	Hot spring bath	-	-	56	Hot spring bath	-	+
5	Hot spring bath	90	+	57	Hot spring bath	-	+
6	Hot spring bath	50	+	58	Hot spring bath	-	-
7	Hot spring bath	-	-	59	Hot spring bath	20	+
8	Hot spring bath	-	-	60	Hot spring bath	10	+
9	Hot spring bath	-	-	61	Hot spring bath	200	+
10	Hot spring bath	-	-	62	Hot spring bath	-	-
11	Hot spring bath	1,100	+	63	Hot spring bath	-	-
12	Hot spring bath	-	-	64	Hot spring bath	10	-
13	Hot spring bath	-	-	65	Hot spring bath	20	-
14	Hot spring bath	1,200	+	66	Hot spring bath	360	+
15	Hot spring bath	220	+	67	Hot spring bath	-	-
16	Hot spring bath	1,000	+	68	Hot spring bath	-	+
17	Hot spring bath	600	+	69	Hot spring bath	-	+
18	Hot spring bath	-	+	70	Hot spring bath	250	+
19	Hot spring bath	-	+	71	Hot spring bath	-	+
20	Hot spring bath	-	-	72	Hot spring bath	180	-
21	Hot spring bath	120	+	73	Hot spring bath	-	+
22	Hot spring bath	10	-	74	Hot spring bath	30	+
23	Hot spring bath	-	-	75	Hot spring bath	-	-
24	Hot spring bath	40	+	76	Hot spring bath	50	-
25	Hot spring bath	-	-	77	Hot spring bath	-	-
26	Hot spring bath	40	+	78	Hot spring bath	-	-
27	Hot spring bath	2,100	+	79	Private house bath	-	-
28	Hot spring bath	6,700	+	80	Cooling tower	-	+
29	Hot spring bath	1,800	+	81	Cooling tower	580	+
30	Hot spring bath	-	+	82	Cooling tower	3,900	+
31	Hot spring bath	200	+	83	Cooling tower	90	+
32	Hot spring bath	-	-	84	Cooling tower	70	+
33	Hot spring bath	-	-	85	Cooling tower	1,300	+
34	Hot spring bath	-	+	86	Cooling tower	-	-
35	Hot spring bath	-	+	87	Cooling tower	-	-
36	Hot spring bath	1,300	+	88	Cooling tower	-	+
37	Hot spring bath	3,200	+	89	Cooling tower	-	-
38	Hot spring bath	410	+	90	Cooling tower	-	-
39	Hot spring bath	-	-	91	Cooling tower	-	-
40	Hot spring bath	-	-	92	Cooling tower	-	-
41	Hot spring bath	-	-	93	Cooling tower	-	-
42	Hot spring bath	-	+	94	Cooling tower	-	-
43	Hot spring bath	10	-	95	Cooling tower	-	-
44	Hot spring bath	14,000	+	96	Cooling tower	-	-
45	Hot spring bath	10	-	97	Cooling tower	290	+
46	Hot spring bath	-	-	98	Cooling tower	10	+
47	Hot spring bath	10	+	99	Cooling tower	-	+
48	Hot spring bath	20	+	100	Cooling tower	-	-
49	Hot spring bath	-	-	101	Cooling tower	-	+
50	Hot spring bath	80	+	102	Cooling tower	-	+
51	Hot spring bath	-	+	103	Hot water resevoir	-	-
52	Hot spring bath	250	+	104	Hot water resevoir	2,600	+

本測定装置は非常に高価であり、広い設置場所も必要であることから、検査現場での使用はかなり困難と言わざるを得なかった。LAMP法は、非常に効率のよい遺伝子増幅法であり、増幅産物が0.5mg/mlと析外れに多く、増幅の有無を反応過程で生成されるピロリン酸塩とマグネシウムの沈殿物の濁度として計測が可能であることから⁷⁾、今回濁度による測定法により、LAMP法の評価を行った。その結果、特異性は蛍光による測定と全く変わらず、供試 *Legionella* 属菌のすべてで増幅が確認でき、非 *Legionella* 属菌の18菌株は全株とも増幅が認められなかった。今回用いたプライマーは *L. micdadei* に対しても反応するように改良されたものであり、他の *Legionella* 属菌と同様、良好に増幅することが確認できた。また、前回の評価⁶⁾ で試験していなかった *L. pneumophila* の血清型6, 8, 9, 12, 13と *L. oakridgensis*, *L. sainthelensis* も増幅されることが確認できた。*L. pneumophila* ATCC 33152株を用いた感度試験の結果では、6 cfu/testの菌量でも増幅を確認できたが、この菌液量での試験の再現性を考慮すると60cfu/testを検出限界とするのが妥当と思われ、これも蛍光法と同じであった。ただし、濁度法は蛍光法と比べ増幅開始時間が遅れる傾向が見られたが、これは蛍光測定と濁度により吸光度測定の感度の差が影響していると考えられた。しかし、その程度は数分であり、20分以内に確認可能なことから実用面では全く問題がないと考えている。今回使用したリアルタイム濁度測定装置 LA-200は市販されている蛍光リアルタイムPCR測定装置の約1/5~1/10の価格で、装置自身も小さいことから (W245×D282×H188mm)、実際の検査現場で使用しやすい方法と思われた。

培養法で *Legionella* 属菌が検出されたにもかかわらず LAMP法で陰性となった8検水の菌量は、10cfu/mlが6件、20, 50および180cfu/100mlがおのおの1件でいずれも菌量としては少ない検体であった。LAMP法の感度は60cfu/test以上であり、今回の実施条件であるサンプル量5 μ l, Qiamp DNA Minikit処理 (Fig.1) から原水中の菌量に換算すると300cfu/100mlと

なる。この値は、培養法の検出限界 (10cfu/100ml) の1/30であり、培養法で陽性、LAMP法で陰性となった例については、この感度差が反映していると考えられる。分離培地上に非 *Legionella* 属菌の集落が出現すると *Legionella* 属菌の発育が抑制され、また選択剤による影響も受けるため^{8, 9)}、平板上の *Legionella* 属菌の集落数は実際の検水中の菌数より低い値となる場合がある。今回の評価で、培養法での菌量が LAMP法の感度以下の検水でも陽性になった例については、このような影響が反映したと推定される。

冷却塔水の23検体を例にとると、培養陰性、LAMP法陽性となった5検体のうちNo. 88, 99, 101と102は使用した WYO α 寒天培地上に非 *Legionella* 属菌が一面に発育したため *Legionella* 属菌が確認できず、結果として培養陰性と判定されたもので、*Legionella* 属菌を完全に否定できない検水であった。No.80は、他の4検体と異なり *Legionella* 属、非 *Legionella* 属菌も含めて WYO α 寒天培地に全く集落を認めなかった検水であった。データは示さないが、これら5検体の LAMP産物を電気泳動で解析した結果、*L. pneumophila* ATCC33152を鋳型としたパターンと同一であり、Jonas らの方法¹⁰⁾ による PCR法でも特異的な増幅が見られたことから、検水中に *Legionella* 属菌の遺伝子が存在していたと考えられた。No.80で遺伝子が存在していると考えられるにもかかわらず、WYO α 寒天培地に全く集落を認めなかった原因としては、検水中に *L. gormanii*, *L. dumoffii* や *L. jordanis* のような WYO α 寒天培地の選択剤で発育が抑制される菌株が存在していたこと^{8, 9)}、また *Legionella* 属菌は貧栄養条件下で、培地上で発育不能な状態いわゆる VBNC (viable but nonculturable) になりやすいことから¹¹⁻¹³⁾、このような状態の菌が存在していたことなどが推定される。これらのことから、環境水を LAMP法で試験する場合、培養法と同等の感度を得るには検水中の *Legionella* 属菌をさらに濃縮する必要があると思われた。また、*Legionella* 属とともに選択培地上に発育可能な微生物が多数混在する検水や、*Legionella* 属が VBNC化しているな

ど、培養法では検出不可能な検体でも LAMP 法を用いることで本菌検出の可能性が示唆されるため、培養法陰性・LAMP 法陽性の例については、さらに詳細な検証が必要と思われた。これらのことを考慮しても、現在培養法で最短でも数日間を要する試験を、LAMP 法では 1 時間足らずで結果が得られることから、環境水の *Legionella* 属菌汚染の試験法として非常に有用と思われた。

結 論

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いた *Legionella* 属菌の検出は、本属菌に対して高い特異性を有し、*L. pneumophila* では 60CFU/test まで検出可能と高い感度を有していた。本法は極めて高い増幅能を特長としていることから増幅の有無を反応過程で生成されるピロリン酸塩とマグネシウムの沈殿物の濁度として計測が可能であり、今回この濁度測定を用いた LAMP 法での *Legionella* 属菌の検出を保存菌株を用いて確認し、実際の環境水を用いて評価を行った。その結果、感度、特異性は蛍光インターカレータを用いた場合と同等で濁度測定の有用性が確認できた。また、実際の環境水での評価では、対照とした培養法より高い陽性率であり、反応 1 時間以内で成績が得られた。

文 献

- 1) 藪内英子, 森 正道, 斉藤 厚, 岸本寿男, 吉澤 晋, 荒川迪生, 木ノ内良治, 王 笠, 古畑勝則, 小出道夫, 山城裕子, 相原雅典, 嶋田昌司, 権平文夫, 杉山純一, 縣 邦雄, 矢野郁也 (1995) *Legionella pneumophila* serogroup 7 による Pontiac fever の集団発生例 II. 疫学調査結果. 感染症学雑誌, 69, 654-665.
- 2) 厚生省生活衛生局企画課監修 (2000) 新版レジオネラ症防止指針. 財団法人ビル管理教育センター, 東京.
- 3) 真柴晃一, 浜本龍生, 鳥飼勝隆 (1993) 温泉水の誤嚥により発症したと考えられるレジオネラ肺炎の 1 症例. 感染症学雑誌, 67, 163-166.
- 4) 徳田 均, 矢作直也, 笠井昭吾, 北村成大, 大塚喜人 (1997) 公衆浴場での溺水後発症した *Legionella pneumophila* serogroup 6 による劇症肺炎の 1 例. 感染症学雑誌, 71, 169-174.
- 5) Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 28, e63.
- 6) 安中敏光, 吉野 学, 百田隆祥, 根本二郎, 砂田亜津子, 小島 禎, 池戸正成, 石井良和, 山口恵三 (2003) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法によるレジオネラ属菌の検出. 日本臨床微生物学雑誌, 13, 19-25.
- 7) Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., and Notomi, T. (2001) Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289, 150-154.
- 8) 奥田敬一, 池戸正成, 藪内英子 (1984) 冷却塔水から *Legionella* 属菌を検出するための新培地: Wadowsky-Yee-Okuda (WYO) 培地. 感染症学雑誌, 58, 1073-1082.
- 9) 春日 修, 高木紀美子, 谷 佳都, 絹巻明生 (1999) 環境水由来レジオネラ属菌の分離方法に関する検討. 感染症学雑誌, 73, 25-34.
- 10) Jonas, D., Rosenbaum, A., Weyrich, S., and Bhakdi, S. (1995) Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoalveolar fluid. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 1247-1252.
- 11) Hussong, D., Colwell, R. R., O'Brien, M., Weiss, E., Pearson, A. D., Weiner, R. M., and Burge, W. D. (1987) Viable *Legionella pneumophila* not culturable by culture on agar medium. *Bio/Technology*, 5, 947-950.
- 12) England, A. C., Fraser, D. W., Mallison, G. F., Mackel, D. C., Skaliy, P., and Gorman, G. W. (1982) Failure to predict culture results from disinfectant-treated air conditioning cooling towers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 240-244.
- 13) Paszko-Kolva, C., Shahamat, C. M., and Colwell, R. R. (1992) Long term survival of *Legionella pneumophila* serogroup 1 under low-nutrient conditions and associated morphological changes. *FEMS Microbiol. Eco.*, 102, 45-55.

【報文】

Legionella pneumophila 血清群 1 群の パルスフィールドゲル電気泳動パターン

古畑 勝則^{1*}, 原 元宣², 福山 正文¹

Diversity of Pulsed-field Gel Electrophoresis Patterns of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 from Various Sources in Tokyo

Katsunori FURUHATA^{1*}, Motonobu HARA² and Masafumi FUKUYAMA¹

¹College of Environmental Health, Azabu University
1-17-71, Fuchinobe, Sagamihara, Kanagawa 229-8501, Japan
²School of Veterinary Medicine, Azabu University
1-17-71, Fuchinobe, Sagamihara, Kanagawa 229-8501, Japan

As a part of the molecular epidemiological studies on *Legionella pneumophila*, the genomic DNA restriction enzyme cleavage patterns of clinical and environmental strains of the serogroup 1 of *L. pneumophila* isolated in Tokyo were analyzed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). The unweight pair group method using arithmetic averages (UPGMA) cluster analysis was then performed based on the results.

1) PFGE of 39 strains was performed using the restriction enzyme *Sfi* I. 5 to 15 bands were observed between the positions corresponding to molecular weight of about 50-850 kbp (kilobase pair). There were two bands between 450 and 500 kbp in 28 strains (72%), one band at 350 kbp in 21 strains (53.8%), one band at 600 kbp in 21 strains (53.8%), and bands at 350 kbp, 450-500 kbp, and 600 kbp in 14 strains (35.9%).

2) A phylogenetic tree was prepared based on the PFGE profiles of the test strains, and UPGMA cluster analysis was performed. The homology between the strains CT1 and CT24 derived from cooling tower water was the highest at 73%. The next highest homology (67%) was observed between CT5 and CT6, and those between CT2 and CT1 and between CT2 and CT24 were 64%.

The above findings clarified that there were no distinct patterns specific for the clinical strains, cooling tower water-derived strains, bathwater-derived strains, soil-derived strains, and strains derived from water of water landscape. Various migration patterns were shown.

(Accepted 30 January 2004)

Key words : *Legionella pneumophila* (レジオネラ ニューモフィラ)/Pulsed-field gel electrophoresis (パルスフィールドゲル電気泳動, PFGE)/Epidemiological studies (疫学的調査).

緒 言

Legionella pneumophila は呼吸器系の病原細菌であり、レジオネラ肺炎やポンティアック熱を

起こすことが知られている^{1, 2)}。1999年、感染症新法の施行に伴い、*L. pneumophila* は新興感染症の起炎菌として四類感染症に指定され、2002年12月末までに465例のレジオネラ症患者が報告

¹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)

²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)

～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、パルス時間は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; 1kbp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%)、

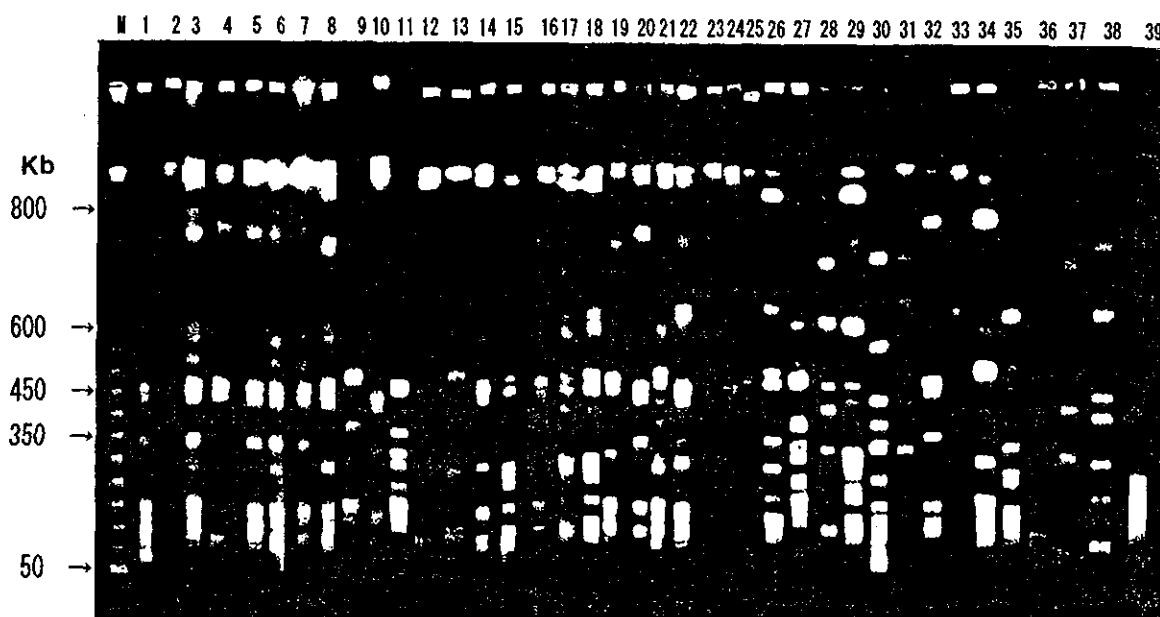


Fig.1. PFGE patterns of *L. pneumophila* serogroup 1 isolates from patients or environmental samples in Tokyo. Lane M, Lambda Ladder DNA standard; lanes 1-25, cooling tower water-derived strains; lanes 26-32, bath water-derived strains; lanes 33-35, soil-derived strains; lanes 36-38, clinical strains; lane 39, decorative water-derived strain.

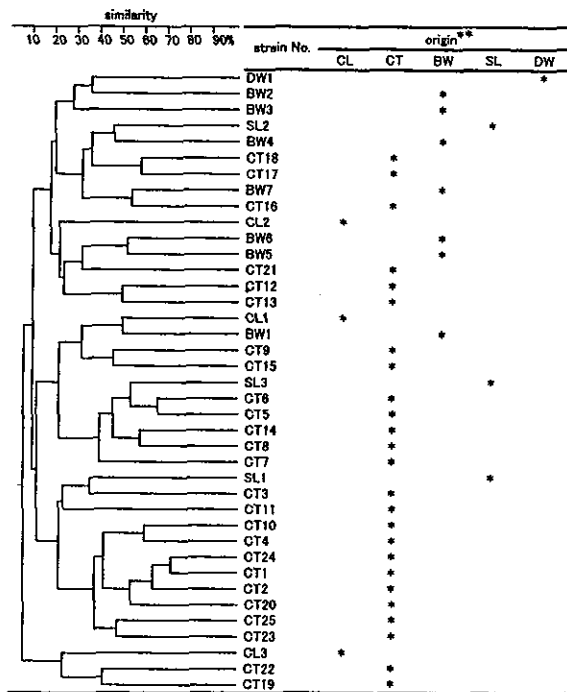


Fig.2. The dendrogram of the PFGE profiles of *L. pneumophila* serogroup 1 isolates from patients or environmental samples in Tokyo.

**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⁶⁾。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³⁾。

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⁸⁾、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⁹⁾。

一方、木内らの報告¹⁰⁾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 epidemicological 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^{1*}, 原 元宣²,
福山 正文¹, 吉田 真一³

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

Katsunori FURUHATA^{1*}, Motonobu HARA²,
Masafumi FUKUYAMA and Shin-ichi YOSHIDA

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

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

³Faculty 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 MIC₅₀ 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 MIC₅₀ of 0.5 μg/ml, azithromycin and sparfloxacin with the MIC₅₀ of 1 μg/ml, and erythromycin, clarithromycin, and gentamicin with the MIC₅₀ of 2 μg/ml. In contrast, the MIC₅₀ 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 が全国各地の土壤に広く生息していることはすでに報告した¹⁾。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²⁾。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

¹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)

²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)

³九州大学大学院・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³⁾。

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), β -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 α 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 α 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 μ g/ml に分布し、ピーク (最頻値) は1 μ g/ml, CAM では0.5~2 μ g/ml に分布し、ピークは2 μ g/ml, AZM では0.125~2 μ g/ml に分布し、ピークは0.5 μ g/ml, MINO では2~32 μ g/ml に分布し、ピークは8 μ g/ml, LVFX では0.25~1 μ g/ml に分布し、ピークは0.5 μ g/ml, SPFX では0.125~1 μ g/ml に分布し、ピークは0.5 μ g/ml, GM では0.25~4 μ 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 (μ 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

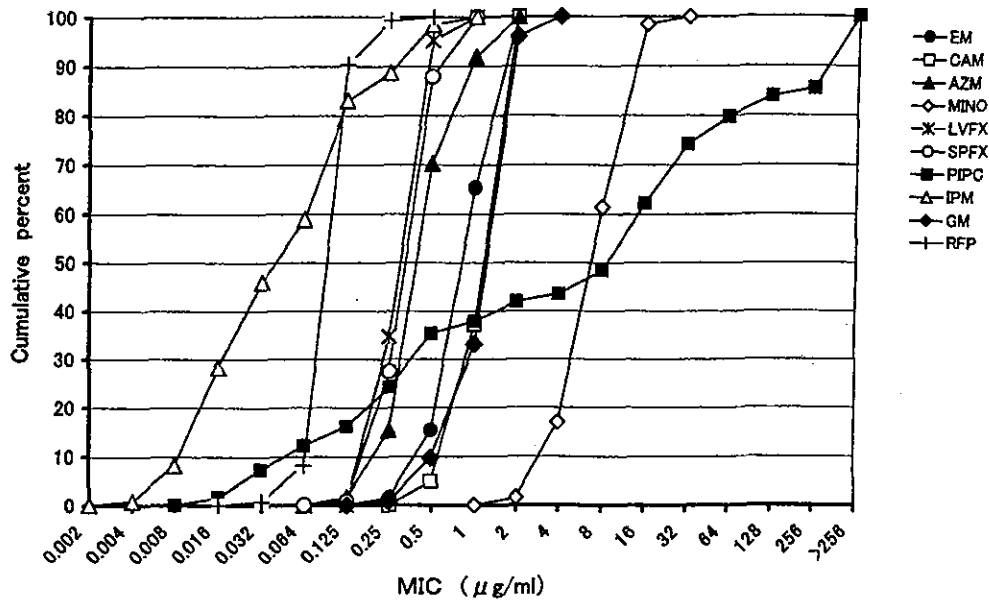


Fig.1. Cumulative distribution of MIC for *L. pneumophila* isolated from hot spring bath waters.

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、≥256 μg/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 MIC₅₀ の比較

各薬剤における 50% MIC 値 (MIC₅₀) と 90% MIC 値 (MIC₉₀) を Table 2 に示した。供試薬剤ごとの MIC₅₀ 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. MIC₅₀, MIC₉₀ 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 ₅₀	MIC ₉₀
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¹⁾。これら土壤由来株の薬剤感受性と温泉水由来株のそれとを比べてみると、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_{90} 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⁵⁾ と温泉水由来株の MIC_{90} 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⁶⁾ は、EM, CAM, SPFX における MIC_{90} 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うまでもない。しかし、レジオネラ属菌の多くが β -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⁷⁾。

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⁸⁾。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⁹⁾ 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¹⁰⁾。この成績と今回の温泉水由来株の MIC_{90} 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 MIC₉₀ 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) 財団法人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.

温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況

¹⁾麻布大学環境保健学部, ²⁾麻布大学獣医学部, ³⁾九州大学大学院医学研究院
古畑 勝則¹⁾ 原 元宣²⁾ 吉田 真一³⁾ 福山 正文¹⁾

(平成 16 年 5 月 17 日受付)

(平成 16 年 6 月 8 日受理)

Key words : *Legionella* spp., hot spring, distribution

要 旨

全国各地の温泉水におけるレジオネラ属菌の生息状況を把握するために、全国 47 都道府県の温泉水についてレジオネラ属菌の分離を試み、以下のような成績を得た。

1) 全国各地の温泉水 710 試料中 204 試料 (28.7%) からレジオネラ属菌が分離され、47 都道府県すべての温泉水から分離された。これを地域別にみると、中国、東北および関東地方の分離率が 30.7%~31.0% とやや高く、次に中部と四国地方が 28.6%~29.2%、北海道、近畿および九州地方の分離率は 25.0%~26.2% とやや低かった。また、これらの分離率を温泉水の pH 別にみると、pH3.1~pH7.5 で 34.8% と最も高く、次に pH7.6 以上で 24.8% であったが、pH3 以下で 4.9% と最も低い分離率であった。

2) 検出された菌数は 10^2 CFU/100ml 未満が 98 試料 (48.0%) と最も多く、次に 10^3 CFU/100ml 台が 71 試料 (34.8%)、 10^4 CFU/100ml 台が 29 試料 (14.2%) と続き、 10^5 CFU/100ml 以上検出された試料が 6 試料 (2.9%) あった。

3) 分離された 251 株について同定したところ、菌種別では 245 株 (97.6%) が *L. pneumophila* に該当し、優占種であった。また、血清群別では、1 群および 5 群に型別される菌株が多く認められた。

以上のことから、菌数は少ないものの、日本各地の温泉水には広くレジオネラ属菌が生息していることが明らかになった。

[感染症誌 78 : 710~716, 2004]

序 文

温泉水によるレジオネラ症は以前から散発的には発生していたが、2002 年、宮崎県日向市の温泉施設において 295 名が発症し、7 名が死亡するという本邦では最大規模のレジオネラ症集団感染が発生し、一段と注目されるようになった¹⁾。本事例は温泉ブームを背景に大きな社会問題に発展し、感染源対策が急務とされている。

レジオネラ属菌は身近な土壤に生息しているこ

とは事実であり²⁾、これらが浴槽水などの人工的水環境に侵入すると推察される。ここでアメーバ内にレジオネラ属菌が取り込まれ、増殖したレジオネラ属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考えられている³⁾。

空気中のレジオネラ属菌を測定する技術が確立されていない現状では、飛散の元となる水環境中のレジオネラ属菌数を知ることが最も重要であり、これをコントロールするためには浴槽水だけでなく、供給システム全体の衛生的維持管理を強化することが望まれる。

温泉水におけるレジオネラ属菌の生息状況調査

別刷請求先：(〒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研究室

古畑 勝則

は、各自治体ごとに個別に行われている地域もあるが^{5,6)}、同時期に同一試験機関で全国調査が行われた最近のものはない。厚生労働省は公衆浴場を含む入浴施設の一斉点検を行っているが、検出率の公表にとどまり、温泉水におけるレジオネラ属菌の詳細な分布状況は公表されていない⁷⁾。

今回、全国各地の温泉水を入手する機会を得たので全国的な温泉浴槽水におけるレジオネラ属菌の生息実態調査を実施した。

材料および方法

1. 供試試料

2003年4月から2004年4月の間に、全国47都道府県において温泉水500mlを採取し、試験に供した。地方での採取の場合は冷蔵にて輸送した。原則的には浴槽水であるが、一部、野湯や源泉も含まれた。

2. 温泉水のpH測定

供試試料を十分に攪拌後、pHメーター(F-22, HORIBA)により測定を行った。

3. レジオネラ属菌の分離および同定

レジオネラ属菌の分離同定は「新版レジオネラ症防止指針³⁾」に準拠した。すなわち、試料200mlを6,000rpm、30分間の遠心分離により1mlに濃縮後、等量の0.2M HCl-KCl溶液(pH2.2)を用いて15分間酸処理を行ってからWYO α 寒天培地(栄研化学)およびGVPC α 寒天培地(日研生物医学研究所)にそれぞれ0.1mlずつ滴下して培地全面にコンラージ棒で塗抹し、37°Cで7日間培養した。培養後、レジオネラ属菌を疑う集落を釣菌して、血液寒天培地とBCYE α 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。グラム陰性の長桿菌で、血液寒天培地には発育せず、BCYE α 寒天培地に発育した菌株をレジオネラ属菌とし、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。

成 績

1. 温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況

全国各地の温泉水からのレジオネラ属菌の分離

Table 1 Isolation of *Legionella* spp. from hot spring baths in Japan

Sampling area	No. of samples examined	No. of positive samples (%)
Hokkaido	56	14 (25.0)
Tohoku	101	31 (30.7)
Kanto	153	47 (30.7)
Chubu	154	45 (29.2)
Kinki	78	20 (25.6)
Chugoku	42	13 (31.0)
Shikoku	42	12 (28.6)
Kyusyu·Okinawa	84	22 (26.2)
Total	710	204 (28.7)

Table 2 Isolation rate of *Legionella* spp. from indoor spa versus open-air bath

Site	No. of samples examined	No. of positive samples (%)
Indoor spa	447	137 (30.6)
Open-air bath	222	61 (27.5)
Total	669	198 (29.6)

状況はTable 1に示すとおり、全体では710試料中204試料(28.7%)から分離された。その内訳は全国47都道府県すべての温泉水から3.8%~100%に分離された。これを地域別にみると、中国、東北および関東地方の分離率が30.7%~31.0%とやや高く、次に中部と四国地方が28.6%~29.2%であり、北海道、近畿および九州地方が25.0%~26.2%とやや低かった。これらのことから地域別における分離率に顕著な差は認められなかった。

採水した試料を内湯と露天に区別し、それぞれの分離率を比較したものをTable 2に示した。内湯では447試料中137試料(30.6%)から、露天では222試料中61試料(27.5%)からそれぞれ分離され、露天における分離率の方がわずかに低率であった。また、温泉水の供給形態を「循環式」といわれる「かけ流し」に区別して両者の分離率と検出菌数の比較をTable 3に示した。循環式では100試料中38試料(38.0%)から分離された。これに対し、かけ流しでも249試料中68試料(27.3%)

Table 3 Isolation rate of *Legionella* spp. with different hot spring water supply systems

Supply systems	No. of samples examined	No. of positive samples (%)	Vaible number (CFU/100ml)		
			Max.	Min.	Mean \pm SD
Circulated	100	38 (38.0)	3.4×10^4	1.0×10^1	$1,701.8 \pm 3,560.2$
Single path flow	249	68 (27.3)	1.3×10^4	1.0×10^1	$939.1 \pm 2,603.9$
Total	349	106 (30.4)			

Table 4 Isolation of *Legionella* spp. from hot spring baths by pH

pH	No. of samples examined	No. of positive samples (%)
≤ 3.0	41	2 (4.9)
3.1-5.9	38	13 (34.2)
6.0-7.5	321	112 (34.9)
7.6-8.5	242	66 (27.3)
$8.6 \leq$	68	11 (16.2)
Total	710	204 (28.7)

から分離され、循環式での分離率と顕著な差はみられなかった。また、温泉水 100ml 中の検出菌数は、循環式が平均 1,702.8CFU、かけ流しが 939.1 CFU であり、循環式の方がわずかに多かったが有意な差は認められなかった。

Table 4 には温泉水の pH 別に分離率を示した。レジオネラ属菌は最低 pH2.8 から最高 pH9.3 の範囲で分離されたが、温泉水の pH によって分離率に差が認められた。すなわち、pH3.1~pH7.5 の範囲が 34.8% と高く、次に pH7.6 以上が 24.8% とそれぞれ高率であったが、pH3 以下では 4.9% と非常に低い分離率であった。このことから、本菌は弱酸性または中性の環境下において高率に存在していることが明らかになった。

レジオネラ属菌が分離された 204 試料における温泉水 100ml 当たりのレジオネラ属菌数を Fig. 1 に示した。菌数については 10^2 CFU 未満が 98 試料 (48.0%) と最も多く、次に 10^3 CFU 台が 71 試料 (34.8%)、 10^4 CFU 台が 29 試料 (14.2%) および 10^5 CFU 以上が 6 試料 (2.9%) あった。

検出菌数のワースト 10 は Table 5 に示すとおり、最高菌数は 3.4×10^4 CFU/100ml であり、10 位は 5.0×10^3 CFU/100ml であった。これら 10 カ

所の内訳は、内湯が 8 カ所と多く、露天は 2 カ所にすぎず、ワースト 5 まではすべて内湯であった。また、温泉水の供給形態別では、6 カ所が循環式、4 カ所がかけ流しであった。なお、上位 2 位まではいずれも循環式であった。これら温泉水の pH の範囲は 6.2~8.5 の中性から弱アルカリ性であった。また、泉質はナトリウム・塩化物泉が 4 カ所で最も多く、硫黄泉が 2 カ所であった。

以上のように、菌数は少ないものの、日本各地の温泉水には広くレジオネラ属菌が生息していることが判明した。

2. 温泉水から分離されたレジオネラ属菌の菌種構成

全国各地の温泉水 204 試料から分離された 251 株のレジオネラ属菌は Table 6 に示すとおり 5 菌種に同定された。なかでも最も高頻度に同定された菌種は *L. pneumophila* であり、245 株 (97.6%) を占めた。その血清群別においては、1 群が 54 株 (21.5%) と最も多く、次に 5 群が 39 株 (15.5%)、6 群が 31 株 (12.4%)、4 群が 29 株 (11.6%)、3 群が 26 株 (10.4%)、10 群が 25 株 (10.0%) であった。このほかにも 7 群、8 群、9 群、11 群、12 群、13 群、15 群に低率ながら群別されたが、2 群と 14 群は 1 株も群別されなかった。

L. pneumophila 以外に同定された菌種では *L. bozemanii* と *L. micdadei* が各 2 株 (0.8%)、*L. birminghamensis* と *L. dumoffii* が各 1 株 (0.4%) であった。

また、各地域ごとに *L. pneumophila* の血清群別分布状況を Table 7 に示した。すなわち、北海道では 5 群が、東北では 1 群と 10 群が、関東では 1 群、4 群および 5 群が、中部では 1 群と 5 群が、近畿と中国では 1 群が、四国では 6 群と 8 群が、九州・

沖縄地方では1群と6群がそれぞれ多く分離される傾向であった。

さらに、検出菌数が多かった10試料について *L. pneumophila* の血清群別でみると、9群が3試料、4群と6群が各2試料、3群、5群、8群、10群および11群が各1試料であり、血清群別による特徴的な傾向はみられなかった (Table 5)。

考 察

日本は有数の温泉大国であり、平成13年度の環境省のまとめでは、全国に26,000本を超える源泉があり、約15,000カ所の宿泊施設がある⁸⁾。こうした施設においてレジオネラ汚染問題が顕在化してきた背景には、源泉の枯渇と施設の大規模化があげられる。

これら温泉水におけるレジオネラ属菌の全国的

Fig. 1 Viable number of *Legionella* spp. in 204 hot spring baths

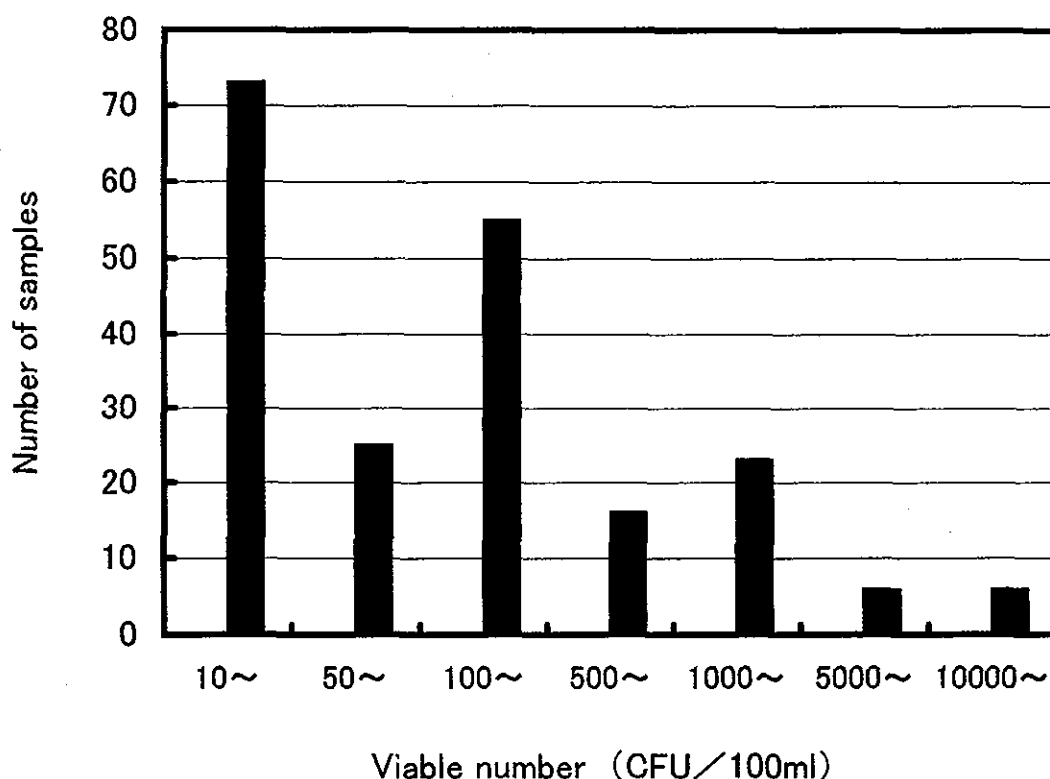


Table 5 Hot spring baths with highest number of viable *L. pneumophila*

No.	Site	Supply systems	pH	CFU/100ml	Serogroup	Quality of hot spring water
1	Indoor spa	Circulated	7.5	3.4×10^4	5	Alkaline salt
2	Indoor spa	Circulated	7.0	1.4×10^4	6	Salt
3	Indoor spa	Single path flow	7.3	1.3×10^4	8	Salt
4	Indoor spa	Single path flow	8.5	1.1×10^4	6	Sulphurated
5	Indoor spa	Circulated	6.2	1.0×10^4	4, 10	Sulphurated
6	Open-air bath	Single path flow	7.1	9.6×10^3	9	Brine
7	Indoor spa	Single path flow	6.9	8.0×10^3	9	Salt
8	Open-air bath	Circulated	6.4	7.2×10^3	11	Earth muriated salt
9	Indoor spa	Circulated	7.0	6.7×10^3	9	Aluminium sulphurated
10	Indoor spa	Circulated	7.7	5.0×10^3	3, 4	Radioactive

な生息状況を把握するために、47都道府県で温泉水を採取してレジオネラ属菌の分離を試みたところ、県別の分離率は大きく異なるものの、全体では710試料中204試料(28.7%)から分離され、北は北海道から南は九州・沖縄まですべての都道府県の温泉水に生息していることが明らかになった。

藪内ら⁹⁾が10年前に行った調査では、北海道から熊本にわたる1道12県の40温泉のうち17温

泉(42.5%)に、宮原ら¹⁰⁾が1998年に行った九州地方における調査では41.0%に、また、佐々木ら¹¹⁾も2000年に行った宮城県内の温泉浴槽水からの調査で41.4%にそれぞれレジオネラ属菌を高率に分離している。これらの報告と比較して今回の分離率は12.3%~13.8%低率であった。この要因として、今回の調査が厚生労働省の一斉点検後であったため、各保健所の指導強化が調査結果に反映したものと考えられた。

温泉水の採取場所を内湯と露天に分けてレジオネラ属菌の分離率を比較した結果、後者の分離率がわずかに低かった。露天の方が粉塵などによりレジオネラ属菌が持ち込まれる機会が多く、分離率は高いものと考えていたが、予想外の結果であった。今回の調査で露天での分離率が低かった要因としては、入浴施設がなく、源泉を直接貯めただけの野湯も露天に含めてまとめたため、分離率が低くなったものと考えられた。

また、温泉水の供給形態に関して、ろ過により浴槽水を再利用している循環式では高濃度のレジオネラ汚染が危惧されている¹¹⁾。一方、大量の温泉水を一時的に利用する、いわゆる「かけ流し」では、レジオネラ汚染問題はないと思われていたが、今回の調査では循環式と大差ない分離率と検出菌数であることから、かけ流しであってもレジオネラ汚染がまったくないとは言えない結果であった。その原因として、かけ流しでも源泉を一旦貯湯することによって貯湯槽内や配管内でレジオネラ属菌が増殖しているものと考えられた。また、冷鉱泉などで泉温が低い場合は、ろ過器のない循環を

Table 6 *Legionella* spp. isolated from hot spring baths

Organisms	No. of strains (%)
<i>L. pneumophila</i>	
serogroup 1	54 (21.5)
2	0 (0)
3	26 (10.4)
4	29 (11.6)
5	39 (15.5)
6	31 (12.4)
7	1 (0.4)
8	12 (4.8)
9	12 (4.8)
10	25 (10.0)
11	6 (2.4)
12	6 (2.4)
13	3 (1.2)
14	0 (0)
15	1 (0.4)
<i>L. birminghamensis</i>	1 (0.4)
<i>L. bozemanii</i>	2 (0.8)
<i>L. dumoffii</i>	1 (0.4)
<i>L. micdadei</i>	2 (0.8)
Total	251 (100.0)

Table 7 Distribution of *L. pneumophila* isolated from hot spring baths at different sampling sites

Sampling area	<i>L. pneumophila</i> serogroup													Total
	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	
Hokkaido	3	0	1	6	1	0	1	0	2	0	0	0	0	14
Tohoku	7	3	2	5	1	0	1	2	7	0	1	0	1	30
Kanto	12	8	13	11	8	0	5	4	7	2	2	0	0	72
Chubu	15	6	9	11	4	1	1	1	5	1	0	2	0	56
Kinki	4	3	2	2	2	0	0	1	2	3	1	0	0	20
Chugoku	5	1	1	2	3	0	0	1	0	0	0	0	0	13
Shikoku	2	2	1	0	5	0	4	0	0	0	0	1	0	15
Kyushu・Okinawa	6	3	0	2	7	0	0	3	2	0	2	0	0	25

行って加熱しているため、この配管内でもレジオネラ属菌が増殖していることは十分考えられたが、今回の調査ではこの点は明かではない。

これまでの報告では温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況と泉質との関連で議論されたものはあまりみあたらない。今回の調査において検出菌数が多かった温泉水の泉質をみても、ナトリウム・塩化物泉、硫黄泉、ナトリウム・塩化物・炭酸水素塩泉、ナトリウム・マグネシウム（・カルシウム）・塩化物泉、放射能線など多種多様であった。したがって、一概にレジオネラ属菌が生息しやすい泉質を特定することは困難であった。また、宮原らはレジオネラ属菌の発育を抑制するような泉質は認めていない¹⁰⁾。

一方、温泉水のpHと分離率との関連をみると、pH3以下の酸性下では他のpH域に比べて4.9%と最も低い分離率であり、酸性下では検出されにくかった。藪内ら⁹⁾や宮原ら¹⁰⁾の報告でも同様な調査結果が得られている。また、著者らが実験的にpH2.5の硫黄泉に*L. pneumophila* 血清群1群、5群、10群の各菌株を10⁶ CFU/mlに添加し、経時的に生残率を調査したところ、2日目にはまったく検出されなくなった(未発表データ)。このことからレジオネラ属菌は酸性条件下では生息困難であり、弱酸性または中性の温泉水から高率に分離された調査結果を裏付けるものと考えられた。

分離菌種の同定結果では*L. pneumophila* が優占しており、特に血清群1群と5群が多く分離された。これまでの報告⁴⁾⁹⁾¹²⁾では温泉水からの分離株は4群、5群、6群が比較的多く、1群は冷却塔から頻繁に分離される血清群であったが、今回は温泉水から1群が多く分離された。この理由は明かではないが、必ずしも1群が冷却塔だけに優占しているのではないことを示している。また、地理的な分布状況をみると、北海道では5群、東北では1群と10群、関東では1群、4群および5群、中部では1群と5群、近畿と中国では1群、四国では6群と8群が、九州・沖縄地方では1群と6群がそれぞれ多く分離され、地域的な傾向は認められなかった。

現在、温泉水のみに適応されるレジオネラ属菌

の規制基準値はない。したがって、現状ではお風呂の浴槽水を念頭に置いて設定された基準値を準用している。この基準値は10CFU/100ml未満であり、実際の試験では不検出を意味する⁹⁾。既述したように温泉水はその泉質が多種多様であり、温泉水の供給システムも施設によって異なることから、画一的な対応策は提案しにくい。安易な高濃度の塩素による浴槽水の消毒だけが必ずしも得策であるとは考えられない。自己管理が推奨される温泉水の衛生的維持管理においては、レジオネラ属菌の生息状況等、現状を十分に把握することが重要であり、施設ごとに供給システムの特徴を熟慮した適切な対応を行うことが強く望まれる。

謝辞：本研究を行うにあたり、温泉水の採取には「日本秘湯に入る会」の多大な御協力をいただいた。心から感謝致します。また、レジオネラ免疫血清(7群～15群)を提供していただいたデンカ生研(株)権平文夫部長に深謝いたします。

なお、本稿の要旨は第19回日本環境感染学会(横浜)において発表した。

本研究は平成16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、H16-健康-055)の支援を受けて行われた。

文 献

- 1) 藪内英子, 縣 邦雄: 日向市の新設温泉施設を感染源とするレジオネラ症集団発生. 感染症誌 2004; 78: 90-8.
- 2) 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. 防菌防黴誌 2002; 30: 555-61.
- 3) 厚生省生活衛生局企画課監修: 新版レジオネラ症防止指針. (財)ビル管理教育センター, 東京, 1999.
- 4) 佐々木美江, 野池道子, 山口友美, 島山 敬, 齋藤紀行, 白石廣行: 宮城県内の温泉施設におけるレジオネラ属菌の実態調査(第1報). 宮城県保健環境センター年報 2001; 19: 62-4.
- 5) 勝田千恵子, 保坂三継, 榎田隆一, 矢野一好, 眞木俊夫: 都市環境水におけるレジオネラ属菌の生息実態と共存生物調査(平成13年度). 東京衛研年報 2002; 53: 219-22.
- 6) 黒木俊郎, 八木田健司, 藪内英子, 縣 邦雄, 石間智生, 勝部泰次, 他: 神奈川県下の温泉浴槽水中における*Legionella* 属菌と自由生活性アメーバ調査. 感染症誌 1998; 72: 1050-5.

- 7) 厚生労働省：入浴施設におけるレジオネラ症防止対策の調査結果，入浴施設等における緊急一斉点検結果について，<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/legionella/030331-1.html>
- 8) 環境省：温泉の保護と利用，平成13年度温泉利用状況，http://www.env.go.jp/nature/onsen/riyou_zititai13.pdf
- 9) 藪内英子，王 笠，荒川迪生，矢野郁也：日本の温泉水中の *Legionella* 属菌の分布．感染症誌 1994；68：549—51.
- 10) 宮原正浩，山口三千男，大堂誠子：温泉水のレジオネラ属菌について．九州薬学会会報 1999；53：75—9.
- 11) 小川正晃：循環式浴槽におけるレジオネラ症発生防止対策．空気調和・衛生工学 2003；77：117—21.
- 12) 古畑勝則：水環境におけるレジオネラ属菌の汚染と制御．日食微誌 1998；15：1—9.

Distribution of *Legionella* spp. in Hot Spring Baths in Japan

Katsunori FURUHATA¹⁾, Motonobu HARA²⁾,
Shin-ichi YOSHIDA³⁾ & Masafumi FUKUYAMA¹⁾

¹⁾College of Environmental Health, Azabu University

²⁾School of Veterinary Medicine, Azabu University

³⁾Faculty of Medical Sciences, Kyushu University

We investigated the inhabitation of *Legionella* spp. in hot spring water in various regions in Japan. The following results were obtained.

1) Of 710 hot spring water samples nationwide, *Legionella* spp. was isolated from 204 samples (28.7%), covering all 47 prefectures. By region, the isolation rate was the highest at 31.0% in the Chugoku district, while the isolation rates in Hokkaido, Kinki, and Kyushu were low, ranging from 25.0 to 26.2%. The rate in Tohoku, Kanto, Chubu, and Shikoku districts was 28.6–30.7%. Regarding the isolation rate by pH of hot spring water, the isolation rate was 4.9% at pH 3 or lower, but 34.8% at pH 3.1–7.5. When pH was 7.6 or higher, the isolation rate was 24.8%.

2) Most frequently, the number of bacteria detected was below 10² CFU/100ml (98 samples, 48.0%). The count was between 10² and 10³ CFU/100ml in 71 samples (34.8%), and between 10³ and 10⁴ CFU/100ml in 29 samples (14.2%). In 6 samples (2.9%), the count was higher than 10⁴ CFU/100 ml.

3) Among the isolates identified, *L. pneumophila* was the predominant species, and particularly, serogroups 1 and 5 were frequently isolated.

The above findings clarified that although the number of the bacteria is low, *Legionella* spp. inhabits hot spring water throughout Japan.

〈原 著〉

病院給湯設備におけるレジオネラ汚染とその除菌

宮本比呂志^{1,4,5)}・池野 貴子^{2,4,5)}・吉村 博子¹⁾・谷口 初美^{1,4,5)}・松本 哲朗^{3,4,5)}*Legionella Contamination of Hot Water Supply Systems in a Hospital and Control Measures for Eradication*Hiroshi MIYAMOTO^{1,4,5)}, Takako IKENO^{2,4,5)}, Hiroko YOSHIMURA¹⁾,
Hatsumi TANIGUCHI^{1,4,5)} and Tetsuro MATSUMOTO^{3,4,5)}¹⁾Department of Microbiology,²⁾Department of Medical Technology,³⁾Department of Urology, University of Occupational and Environmental Health,⁴⁾Legionella Working Group in Infection Control Committee of UOEH Hospital,⁵⁾Kitakyushu Regional Infection Control Team

要 旨

レジオネラによる院内感染の主な感染源は病院の給水・給湯設備である。しかし、我が国では病院給湯設備のレジオネラ汚染と除菌についての詳細な報告はなく、その実態さえ不明である。産業医科大学病院において2003年7月に病棟の特別浴槽シャワーヘッドより *Legionella pneumophila* が検出され、追加調査で貯湯槽からも *L. pneumophila* が検出された。中央循環式の給湯設備であることより設備全体の汚染があると判断し、1年間に渡り汚染調査と除菌作業を繰り返した。この調査・対策期間中に合計52箇所でのべ119回の培養検査を行い、迅速な除菌対策のため必要に応じPCR法も併用した。培養検査で15箇所のべ18検体から汚染が検出され、その内訳は貯湯槽3箇所、末端給湯栓8箇所、シャワーヘッド4箇所であった。これらからの分離株はパルスフィールド電気泳動により3つの遺伝子型にしか分類できず、汚染が給湯水の循環により施設全体に広がっていたことが示唆された。除菌対策として(1)給湯水を75°Cで24時間循環させながら末端給湯栓類(983箇所)で放水を1年に1回行うこと(2)貯湯槽の清掃(3)給湯水温を66°Cに上げて維持管理することを実施した。その結果、汚染は検出限界以下(5 CFU/100 mL)に除去できた。この期間中にレジオネラ肺炎の院内発生は認めず、水道料金や灯油料金の負担が除菌対策に伴って増えることはなかった。給湯水の昇温循環運転と末端給湯栓類からの放水作業は安価で有効な除菌法であった。

Key words : レジオネラ, 院内感染, 給湯水

はじめに

レジオネラ属菌はグラム陰性の通性細胞内寄生菌でヒトに急性肺炎(レジオネラ肺炎, 在郷軍人病)やインフルエンザのような熱性疾患(ポンティアック熱)を引き起こす病原性を持っている。本属菌は空調用冷却塔水, 給湯水, 修景用水, 循環式浴槽水などの人工水環境に混入・

増殖し, それらが感染源になることが明らかにされている¹⁾。米国での1980年から1998年までの調査²⁾によるとレジオネラ症の25~45%が院内感染であり, その感染源の多くは給水・給湯設備である^{3,4)}。我が国では, 1981年に斎藤ら⁵⁾が本邦初のレジオネラ症を報告し, 同年には柏木ら⁶⁾により最初の院内感染集団発生事例も報告された。厚生省レジオネラ研究班が行った調査⁷⁾によると, 1979年から1992年の14年間に我が国でレジオネラ症と診断された患者数は86名であり, 詳細な情報が得られなかった6例を除いた80名のうち19例

¹⁾産業医科大学医学部微生物学, ²⁾産業保健学部第2生体情報学, ³⁾医学部泌尿器科学, ⁴⁾産業医科大学病院病院感染防止委員会, ⁵⁾北九州地域感染制御チーム(KRICT)