

研究発表

1. 論文発表

吉田 真一

Ishikawa Y, Mizunoe Y, Kawabata S, Takade A, Harada M, Wai SN, and Yoshida S: The iron-binding protein Dps confers hydrogen peroxide stress resistance to *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* 185(3):1010-1017, 2003.

Takade A, Umeda A, Matsuoka M, Yoshida S, Nakamura M, and Amako K: Comparative studies of the cell structures of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* using the electron microscopy freeze-substitution technique. *Microbiol. Immunol.* 47(4): 265-270, 2003.

Amako K, Takade A, Umeda A, Matsuoka M, Yoshida S, and Nakamura M. Degradation process of *Mycobacterium leprae* cells in infected tissue examined by the freeze-substitution method in electron microscopy. *Microbiol. Immunol.* 46(69): 387-394, 2003.

Dutta s, Dutta D, Dutta P, Matsushima S, Bhattacharya SK, and Yoshida S. *Shigella dysenteriae* serotype 1, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 9(11):1471-1474, 2003

Dutta S, ghosh A, Ghosh K, Dutta D, Bhattacharya SK, Nair GB and Yoshida S. Newly emerging multiple-antibiotic-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 strains in and around Kolkata, India, are clonal. *J. Clin. Microbiol.* 41(12):5833-5834, 2003

Miyamoto H, Yoshida S, Taniguchi H, and Shuman HA: Virulence conversion of *Legionella pneumophila* by conjugal transfer of

chromosomal DNA. J. Bacteriol. 185(22), 6712–6718, 2003.

Irie M, Miyamoto H, Ikeda M, and Yoshida S.: A 3-year follow-up study of anti-*Legionella* antibodies in users of Japanese 24-hour hot water baths. J. Occup. Health 46:68–77, 2004.

Seki M, Iida K, Saito M, Nakayama H, and Yoshida S. Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate. J. Bacteriol. 186(7):2046–2051, 2004

Ohnishi H, Mizunoe Y, Takade A, Tanaka Y, Miyamoto H, Harada M, and Yoshida S: *Legionella dumoffii* DjlA, a member of the DnaJ family, is required for intracellular growth. Infect. Immun. 72: 3592–3603, 2004

Kajiwara H, Saito M, Ohga S, Uenotsuchi T, and Yoshida S: Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. Infect. Immun. 72: 5073–5079, 2004

Dutta S, Iida K, Takade A, Meno Y, Nair GB, and Yoshida S. Release of Shiga toxin by membrane vesicles in *Shigella dysenteriae* serotype 1 strains and in vitro effects of antimicrobials on toxin production and release. Microbiol. Immunol. 48(12):956–969, 2004.

Dutta S et al: Alteration in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in Quinolone-resistant *Shigella dysenteriae* serotype 1 clinical isolates from Kolkata, India. Antimicrob Agents Chemother 49(4):1660–1661, 2005.

Iida K, Ueda Y, Kawamura Y, Ezaki T, Takade A, Yoshida S and Amako K.: *Paenibacillus motobuensis* sp. nov., isolated from a garbage disposal machine. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1811–1816, 2005

Furuhata K, Annaka T, Ikedo M, Fukuyama M, and Yoshida S. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and conventional culture for the detection of *Legionella* species in hot spring water samples in Japan. *Biocontrol Science* 10(3):117-120, 2005

Kikuchi T, Mizunoe Y, Takade A, Naito S, and Yoshida S. Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. *Microbiol. Immunol.* 49(9):875-884, 2005.

Iida K, Seki M, Saito M, Kawamura Y, Kajiwara H, and Yoshida S. Capsule of *Streptococcus pyogenes* is essential for delayed death of mice in a model of streptococcal toxic shock syndrome. *Microbiol. Immunol.* 50(2):127-130, 2006

Piao Z, Sze C C, Barysheva O, Iida K, and Yoshida S. Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(2):1613-1622, 2006.

古畑 勝則

- 1)Furuhata,K., Annaka,T., Ikedo,M., Fukuyama,M., Yoshida,S. : Comparison of loop-mediated isothermal amplification(LAMP)and conventional culture for the detection of *Legionella* species in hot spring water samples in Japan. *Biocontrol Sci.*, 10:117-120(2005)
- 2)斎藤優子、小澤一弘、小林崇良、久保亮一、古畑勝則：安全性を配慮したレジオネラ属菌検査用 GVPN 培地の性能. *用水と廃水*, 47 : 716-720(2005)
- 3)古畑勝則：レジオネラ症感染防止対策に関する研究(研究奨励賞受賞論文). *防菌防黴誌*, 33 : 397~406(2005)
- 4)古畑勝則：温泉水におけるレジオネラ汚染とその対応. *水環境学会誌*, 28 : 559- 563(2005)
- 5)古畑勝則、宮本比呂志、福山正文：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(2004)

6)安中敏光、小島 禎、池戸正成、古畑勝則 : LAMP 法による環境水からの
Legionella 属菌の検出. 防菌防黴誌, 32 : 195-201(2004)

7)古畑勝則、原 元宣、福山正文 : *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. 防菌防黴誌, 32 : 287-291(2004)

8)古畑勝則、原 元宣、福山正文、吉田真一 : 温泉水由来 *Legionella pneumophila*
の薬剤感受性. 防菌防黴誌, 32 : 343-347(2004)

9)古畑勝則、原 元宣、福山正文、吉田真一 : 温泉水からのレジオネラ属菌の分
離状 況. 感染症誌, 78 : 710-716(2004)

10)Furuhata,K., Dogasaki,C., Hara,M., Fukuyama,M. : Inactivation of
Legionella pneumophila from whirlpool bath water by grapefruit
(*Citrus paradisi*) seed extract. *Biocontrol Sci.*, 8: 129-132(2003)

宮本比呂志

Virulence conversion of *Legionella pneumophila* by conjugal transfer of
chromosomal DNA, 2003. *J. Bacteriol.* 185(22): 6712-6718.

アメーバ寒天法を使用した *Legionella pneumophila* 環境分離株の病原性評価
感染症学雑誌 2004; 78(10): 923-924.

病院給湯設備におけるレジオネラ汚染とその除菌
環境感染 2004; 19(4) : 483-490.

レジオネラの病原性発現機構

Mebio 2004; 21(12): 63-68.

レジオネラ症 Update 菌側からみた新しい展開 -レジオネラのゲノム解読か
らみえてきたもの- 臨床と微生物 32 (7) 6-12 2005年7月

レジオネラ 微生物感染学 (光山正雄編) 169-177 南山堂 2005年11月

レジオネラはどうやってヒトの細胞の中で生き延びるのか 最新医学 61 (2)
印刷中 2006年2月

三宅 正紀

Miyake M., Watanabe T., Koike H., Molmeret M., Imai Y., Abu Kwaik Y. Characterization of *Legionella pneumophila* *pmiA*, an gene essential for infectivity of protozoa and macrophages. (2005) Infect. Immun. 73: 6772-6282.

Miyake M., Fukui F., Imai Y. Differences in protein synthesis between wild type and intracellular growth-deficient strains of *Legionella pneumophila* in U937 and *Acanthamoeba polyphaga*. (2006) Microb. Pathog. (in press)

江崎孝行

江崎孝行, 大楠清文, 河村好章DNAマイクロアレイを用いた環境サンプル中の微生物群集の解析工藤俊章, 大熊盛也編「難培養微生物研究の最新技術」シーエムシー出版 東京 2004、94-100

Yabuuchi E and Ezaki T. The Alpha-, Beta-,Delta-, and Epsilon proteobacteria. Garrity G, ed. Bergey's Manual of Systematic Microbiology Springer, New York, 2005

江崎孝行 他：呼吸器感染症の網羅的診断に向けて 分子呼吸病 8巻4号 61-64
2004

Amano M. Et.al. Quantitative Microarray-Based DNA-DNA hybridization assay for measuring genetic distances among bacterial species and its application to the identification of family *Enterobacteriaceae*. Microbiol. Immunol49 (3) 255-263、2005

大楠清文、他：特定菌検出—ウイルス 検査と技術 33 (11) ,1218-1222,2005

Use of the *dnaJ* gene for the detection and identification of all *Legionella*

pneumophila serogroups and description of the primers used to detect 16S rDNA gene sequences of major members of the genus *Legionella*. Microbiol. Immunol 47:859-869, 2003

Niwa T. et. al Lytic enzyme, labiase for a broad range of Gram-positive bacteria and its application to analyze functional DNA/RNA. J. Microbiol. Methods 61:251-260, 2005

江崎孝行, 大楠清文: 外来で利用可能な STD の網羅的遺伝子診断法を求めて 泌尿器外科 18:798-804, 2005

大楠清文, 江崎孝行: これからの微生物検査 遺伝子検査臨床と微生物 31:610-622, 2004

大楠清文, 河村好章, 江崎孝行 新しい感染症検査法の発展と動向: ゲノムベースの細菌検査の基礎化学療法の領域 21:301-310, 2005

2. 学会発表

吉田 真一

史 君綽、朴 貞玉、吉田 真一: レジオネラ属細菌によるバイオフィルム形成 第 76 回日本細菌学会総会 ホテル日航熊本 2003

朴 貞玉、史 君綽、飯田 健一郎、Barysheva Oksana、吉田 真一: *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 のバイオフィルムの形態を調節する温度依存性プロモーター領域の解析 第 57 回日本細菌学会九州支部総会 福岡県歯科医師会館 2004

朴 貞玉、飯田 健一郎、Barysheva Oksana、吉田 真一: *Legionella pneumophila* のバイオフィルムの形態を調節する温度依存性プロモーター領域の解析 第 78

回日本細菌学会総会 タワーホール船堀（江戸川区総合区民ホール）2005

松田 史子、藤井 潤、小川 みどり、吉田 真一: レジオネラの細胞内増殖を抑制する 2-deoxy-D-gulucose の作用—DNA array による解析から—
第 78 回日本細菌学会総会 タワーホール船堀（江戸川区総合区民ホール）2005

Oksana Barysheva, Kenichiro Iida, Shinichi Yoshida: Application of unstable GFP variants to kinetic studies of *Legionella* gene expression
第 78 回日本細菌学会総会 タワーホール船堀（江戸川区総合区民ホール）2005

T. Qin, K. Iida, and S. Yoshida: *Legionella dumoffii* TEX-KL mutant in a gene homologous to traC is defective in epithelial cell invasion. 6th International Conference of Legionella (Chicago) Program and Abstracts Book p.27, October 17, 2005

朴 貞玉、飯田 健一郎、吉田 真一: *Legionella pneumophila* の *icmN* の発現とその機能 第 79 回日本細菌学会総会 金沢市観光会館 2006

古畑 勝則

- 1)古畑勝則：レジオネラ症感染防止対策に関する研究(研究奨励賞受賞講演). 日本防 菌防黴学会第 32 回年次大会(2005.5)大阪.
- 2)古畑勝則：レジオネラ属菌の汚染対策と検査法の将来展望(パネルディスカッション). 日本防菌防黴学会第 31 回年次大会(2004.5)東京.
- 3)古畑勝則：レジオネラ属菌の試験法(現状と問題点)(講演). 日本防菌防黴学会 2004 年度秋季合同シンポジウム(2004.10)福井.
- 4)古畑勝則、福山正文：全国各地の温泉水におけるレジオネラ属菌の生息状況. 第 19 回日本環境感染学会(2004.2)横浜.

宮本比呂志

レジオネラのマクロファージ侵入と細胞内動態に関する遺伝子と機能
第 77 回 日本細菌学会総会 シンポジウム 4:細菌成分と宿主の分子の interaction、平成 16 年 4 月、大阪

レジオネラ属菌の細菌学的特性 日本防菌防黴学会 第31回年次大会 パネル
ディスカッション：水環境におけるレジオネラ属菌検査法の現状と将来、平成
16年5月、東京

アメーバ寒天法を使用した *Legionella pneumophila* 環境分離株の病原性評価
第57回 日本細菌学会九州支部総会、平成16年9月、福岡

アメーバとレジオネラの宿主寄生体関係 第57回 日本寄生虫学会南日本支
部大会 特別講演、平成16年10月、北九州

病院給湯設備のレジオネラ汚染とその除菌 第20回 日本環境感染学会総会、
平成17年2月、神戸

土壌より分離された *Legionella* 属の新菌種と思われる4菌株について
第78回日本細菌学会総会 平成17年4月 東京

中央循環式の給湯設備のレジオネラ汚染とその除菌
日本防菌防黴学会 第32回年次大会 平成17年5月 大阪

特別セミナー「レジオネラの病原性発現機構」
Bacterial Adherence & Biofilm 第19回学術集会 平成17年7月 北九州

三宅正紀

三宅正紀、福井貴史、伊藤佐生智、辻勉、今井康之：
Legionella pneumophila のマクロファージ感染におけるアクチン結合蛋白質
p57 との相互作用に関する検討
第123年会日本薬学会(長崎)、要旨集-3 p.147、平成15年3月29日

渡邊拓郎、今井康之、三宅正紀：
Legionella pneumophila pmi 変異株 GB112 の性状解析
第76回日本細菌学会総会(熊本)、抄録 p.316、平成15年4月2日

福井貴史、今井康之、三宅正紀：
Legionella pneumophila の熱ショック蛋白質発現と細胞内増殖性との相関に

ついて

第76回日本細菌学会総会(熊本)、抄録 p.317、平成15年4月2日

三宅正紀、福井貴史、辻勉、今井康之：

Legionella pneumophila のマクロファージ感染におけるアクチン結合蛋白質 p57 との相互作用について

第76回日本細菌学会総会(熊本)、抄録 p.317、平成15年4月2日

Masaki Miyake, Takashi Fukui, Yasuyuki Imai, Howard A. Shuman :

Legionella pneumophila intracellular growth and protein expression profile

within macrophage and protozoa.

American Society for Microbiology 103rd General Meeting (Washington D.C.)

Abstracts p.34, May 19, 2003

Sergey Pampou, Masaki Miyake, Irina Morozova, James Russo, Howard Shuman, Sergey Kalachikov :

Legionella pneumophila microarrays for expression analysis and whole-genome comparisons among related species.

American Society for Microbiology 103rd General Meeting (Washington D.C.) Abstracts p.204, May 19, 2003

三宅正紀、渡邊拓郎、Maëlle Molmeret、今井康之、Yousef Abu Kwaik :

Legionella pneumophila の細胞内寄生性に関与する新規遺伝子について

第124年会日本薬学会(大阪)、要旨集-3 p.142、平成16年3月29日

三宅正紀、今井康之

Legionella pneumophila アメーバ及びマクロファージ感染性遺伝子 *lipA* の機能解析

第77回日本細菌学会総会(大阪)、抄録 p.185、平成16年4月2日

原田俊彦、今井康之、三宅正紀

Legionella pneumophila のマクロファージNADPHオキシダーゼ産生活性酸素による殺菌機構からの回避

第77回日本細菌学会総会(大阪)、抄録 p.186、平成16年4月2日

林豪士、三宅正紀、辻勉、今井康之

免疫系特異的アクチン結合蛋白質p57のレジオネラ感染における特有なリクルートメントについて

第77回日本細菌学会総会(大阪)、抄録 p.187、平成16年4月2日

Masaki Miyake, Takurou Watanabe, Maëlle Molmeret, Yasuyuki Imai, Yousef Abu Kwaik.

Characterization of *Legionella pneumophila pmi* locus which has a great influence on infectivity to protozoa.

American Society for Microbiology 104rd General Meeting (New Orleans) Abstracts p.106, May 26, 2004

原田俊彦、三宅正紀、今井康之

レジオネラ属菌の食細胞NADPHオキシダーゼ産生活性酸素による殺菌からの回避機構について

ファーマ・バイオフォーラム2004(東京) 講演要旨集 p.35、平成16年11月6日

林豪士、三宅正紀、伊藤佐生智、辻勉、今井康之

アクチン結合蛋白質p57のレジオネラ感染における特異的挙動について

16年度日本薬学会東海支部例会(静岡) 講演要旨集 p.39、平成16年12月4日

三宅正紀、原田俊彦、今井康之

レジオネラのマクロファージ感染初期における NADPH オキシダーゼ産生活性酸素 種による殺菌からの回避について

第125年会日本薬学会(東京)、要旨集3 p.87、平成17年3月30日

三宅正紀、原田俊彦、今井康之

レジオネラ感染による食細胞 NADPHオキシダーゼ産生活性酸素種の産生抑制

第78回日本細菌学会総会(東京)、抄録 p.100、平成17年4月4, 5日

菅谷則子、今井康之、三宅正紀

リポドラフトを介した *Legionella pneumophila* のマクロファージ感染について

第78回日本細菌学会総会(東京)、抄録 p.102、平成17年4月4日

小池仁美、今井康之、三宅正紀

*Legionella pneumophila*新規細胞内増殖制御因子PmiAの機能解析

第78回日本細菌学会総会(東京)、抄録 p.102、平成17年4月4, 5日

Masaki Miyake, Takurou Watanabe, Hitomi Koike, Maëlle Molmeret, Yasuyuki Imai, Yousef Abu Kwaik.

Identification and characterization of *Legionella pneumophila pmiA*, a locus involved in infectivity of protozoa and macrophages.

6th International Conference of Legionella (Chicago)

Program and Abstracts Book p.28, October 17, 2005

三宅正紀、今井康之

*Legionella pneumophila*新規細胞内増殖制御因子の同定及び機能解析

中部乳酸菌研究会(甲府) 平成17年11月25日

田口 善夫

馬庭 厚 当院のレジオネラ症診療の現状 第2回奈良感染症検査フォーラム
2004.9.16 奈良

馬庭 厚, 田中栄作, 井上哲郎, 櫻本 稔, 水口正義, 前田勇司, 寺田邦彦,
後藤俊介, 竹田知史, 岡元昌樹, 野間恵之, 弓場吉哲, 小橋陽一郎, 田口善夫:
入院市中肺炎における死亡例の臨床的検討
第45回日本呼吸器学会学術講演会 2005.4.14 千葉

IV. 研究成果の刊行物・別刷

1. レジオネラの生態に関する研究

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 10² CFU/100ml 未満が 98 試料 (48.0%) と最も多く、次に 10² CFU/100ml 台が 71 試料 (34.8%)、10³ CFU/100ml 台が 29 試料 (14.2%) と続き、10⁴ 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^{4)~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℃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

平成16年8月20日

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」といわゆる「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 10^2 CFU 台が 71 試料 (34.8%)、 10^3 CFU 台が 29 試料 (14.2%) および 10^4 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

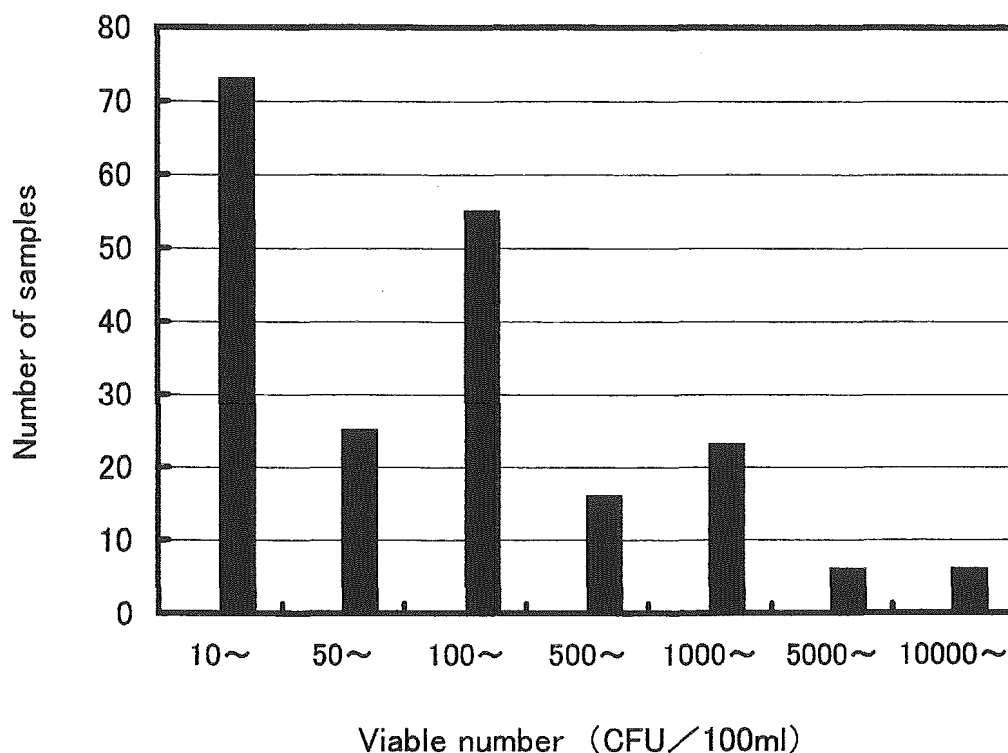


Table 5 Hot spring baths with highest number of viable *L. pneumophila*

| 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⁴⁾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 10^6 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

平成16年8月20日

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³⁾。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，畠山 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_zititail3.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.

【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, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan

²School of Veterinary Medicine, Azabu University
1-17-71, Fuchinobe, Sagami-hara, 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)