

そ2日間を要することから、極めて少量の菌が感染しても十分に菌が増殖しその後の培養で確認可能となるよう、アメーバへの菌の接触と培養を4日間とした。

本法を用いた予備試験として菌液の10倍希釈系列を用いてID<sub>50</sub>を求めた(図2)。試験に供したレジオネラはBCYE $\alpha$ 培地で30°C、3日間(一部4日間)培養した菌を用いた。宿主アメーバでのレジオネラの増殖は菌数が83.4 cfuのとき100%のウェルで感染が確認され、同様に9.4 cfuで100~80%、1.1 cfuでは40~10%のウェルで感染が確認された。アメーバを宿主とした場合のレジオネラのID<sub>50</sub>は10 cfu以下の低値であることが推定された。ついで、2倍希釈系列を用いてより多くのデータ量をとることでID<sub>50</sub>の正確な算出を行った。図3に2倍希釈系列での試験結果を示した。

### 3-2. ID<sub>50</sub>と菌の培養条件の関係

本試験では、30°Cおよび35°Cの温度で3日間培養し、温度による差を検知できるか、当該方法の感度試験を行った。表-1に2つの温度条件におけるID<sub>50</sub>の算出結果を示した。平均ID<sub>50</sub>は30°Cの場合2.5 $\pm$ 0.1 cfu、一方、35°Cでは5.8 $\pm$ 0.8 cfuと算出され、両条件とも再現性の良い結果が得られた。両温度条件のID<sub>50</sub>の差は有意(p<0.01)で、35°Cの培養温度で得られたレジオネラの感染性は30°C培養の菌に比べて低いことが示された。また、1回の試験結果であるが、同一の培養条件(30°Cで、BCYE $\alpha$ プレート培養)で3日間培養した菌と5日目の菌を用いてID<sub>50</sub>を比較したところ、3日目のID<sub>50</sub>は2.5であったのに対し、5日目では6.4に上昇し、

宿主アメーバへの感染力が低下していた(図4)。

### 3-3. 水中に浮遊状態にあるレジオネラのID<sub>50</sub>の変動

昨年度と同様に、塩素除去した水道水中に浮遊状態に置かれたレジオネラの感染能の変化を検討した。本試験ではBCYE $\alpha$ 培地で30°C、3日間培養したレジオネラを使用した。菌の希釈系列に関しては、前年度の試験成績を参考に用いた。これを検知する希釈系列としては、ウェル内菌数(100 $\mu$ lあたり)として最大10<sup>4</sup> cfu/well程度を要するものと推測されることからこの濃度の菌液から2倍希釈系列を用いて感染を行った。

表-2に3回の試験におけるID<sub>50</sub>の算出結果をまとめた。試験水に浮遊直後(D0: day 0)のID<sub>50</sub>は2.2 $\pm$ 0.1 cfuと先述の試験同様低値を示した。浮遊状態に1週間置かれた菌(D7)のID<sub>50</sub>は35.2 cfu (21.9-48.0 cfu)と計算された。参考までに、浮遊状態に4日間置かれた菌(D4)のID<sub>50</sub>を調べたが、D0とほぼ同様の値で菌の感染性は保持されていた(実験回数1回)。さらに、浮遊状態に2週間置かれた菌(D14)のID<sub>50</sub>は127.7cfu、3週間目の菌(D21)では245.5 cfu (140.7-351.1 cfu)と計算された(図-5)。図-6には各測定時における菌の感染能の変化量(ID<sub>50</sub><sub>DN</sub>/ID<sub>50</sub><sub>D0</sub>)(■)と各試料のcfu(BCYE $\alpha$ 培地での増殖能)を(◆)で示した。また、昨年度に測定した宿主アメーバで増殖した菌を用いたcfu(○)を追加した。その結果、浮遊状態に置かれたレジオネラは、BCYE $\alpha$ 培地での増殖性が速やかに低下し、おそらくはVNC状態に陥るものと推測され

た。昨年の報告にあるように、宿主アメーバ由来の菌では3週間目までに目立った増殖能の低下は観察されておらず、両者の違いが明らかとなった。一方、培養ならびに宿主由来のいずれの菌においてもアメーバへの感染力は比較的速やかに低下し、ID<sub>50</sub>を基にした感染力の評価により、1週間目で試験開始時のおよそ1 log<sub>10</sub>、3週間目にはおよそ3 log<sub>10</sub>の低下が認められた( $y = 0.8671x^{-3.3776}$ ) (図-6)。

#### D. 考 察

本研究では、環境中の宿主であるアメーバに対するレジオネラ属菌の感染性を調べるマイクロプレートアッセイ法を考案した。マイクロプレートの各ウェルに宿主アメーバのシートを作成し、これに段階希釈したレジオネラを摂取し、一定時間(2日間)培養し、その上清をBCYE $\alpha$ 培地に植えて、各段階希釈におけるアメーバでの増殖の有無を確認した。これより宿主アメーバに対するID<sub>50</sub>を算出した。本法では、レジオネラがアメーバにもれなく接触できること、アメーバでのレジオネラの増殖が把握できることが条件となる。そのため、宿主アメーバをウェル底面全体に付着させ、接触期間にアメーバのシスト化を防いだ。当該方法の妥当性についてはBCYE $\alpha$ 培地での培養温度5°Cの差がアメーバへの感染性に与える影響(Mauchline et al., 1994, Edelstein et al., 1987)を定量的に測定することで確認した(図4)。当該試験方法は環境中でのレジオネラの増殖を評価するための初めての試験方法である。ちなみに、レジオネラ属菌のID<sub>50</sub>に関しては動物実験データが報告されており、モルモット腹腔内

感染の場合10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup> cfu (Bollin,ら1985)、モルモットのエアロゾルによる経気道感染の場合で129 cfu 以下 (Berendt ら1980)というデータが報告されている。

今回実験に供したBCYE $\alpha$ 培地由来のレジオネラは浮遊状態に保つことで培地での増殖性も低下することが示され、昨年度のアメーバ由来の菌と性質を異にすることが示された。*L. pneumophila*の血清型1の菌株を用いて、ほぼ本試験と同様な条件、即ち滅菌水道水を用いて42°Cで菌を培養した場合の、全菌数、生菌数および培養可能菌数の継時変動を調べた報告によると、培養可能菌数は本試験と同様3週間でおおよそ2logの低下が見られている(Ohnoら2003)。その際、全菌数および生菌数はほとんど変化しておらず、VNCの状態に陥ったことが示されている。本研究の目的である、アメーバへの感染性の変化については、浮遊状態におかれたレジオネラは宿主アメーバに対する感染性を比較的速やかに消失することが確認された。仮に、当該実験においても生菌数に変化が無いものと仮定すると、VNC化したレジオネラはアメーバにより感染性を回復するものではないことが示された。これまで、「VNC化したレジオネラはアメーバへの感染により増殖能を回復する」と説明されてきたが、昨年および本年度の研究成果はこの説を支持しないものであった。

#### E. 結 論

浴槽水中に存在するレジオネラの増殖能の変化は衛生管理のあり方に影響する問題で、今回初めて宿主アメーバを用いて環境中での増殖能の変化の評価方法が確立された。

当該方法を用いて水中に浮遊状態に置かれたレジオネラは比較的速やかに宿主アメーバへの感染性を消失することが確認された。宿主アメーバに対する感染性の消失がヒト等に対する感染性を表現しているかは今後の研究に待たれるが、仮にヒトの細胞への感染性も同様の傾向を示すものであるならば、おのずから浴槽水のレジオネラ汚染量の指針値に影響するものと考えられる。

#### F. 参考文献

1. Page, F.C. (1967) Taxonomic criteria for limax amoeba, with descriptions of 3 new species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. J. Protozool. 14:499-521.
2. Edelstein, P.H., et al., (1987) Influence of growth temperature on virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 55:2701-2705.
3. Bollin, G.E. et al., (1985) Difference in virulence of environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 21:674-677.

4. Mauchline, W.S. et al., (1994) Growth temperature reversibly modulates the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 62:2995-2997.
5. Berendt R.F. et al., (1980) Dose-response of guinea pigs experimentally infected with aerosols of *Legionella pneumophila*. *J. Infect. Dis.* 141:186-192.
6. Ohno, A., et al., (2003) Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2540-2547.

#### G. 研究発表

なし

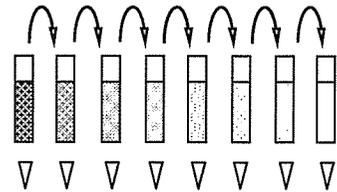
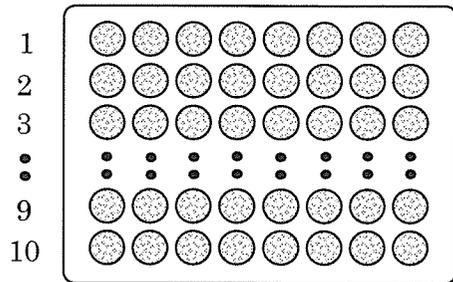
#### H. 知的所有権の取得状況

なし

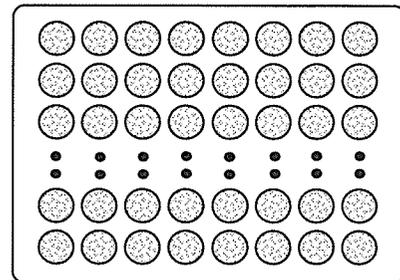
図-1、マイクロプレートアッセイ法の手順

- 1) PY 培地でアメーバを培養。遠心洗浄で培地を除去し、細胞数を  $1.0 \times 10^6$  cells/ml となるように 10xAS で調整。
- 2) 48 ウェルマイクロプレートの各ウェルにアメーバ浮遊液を 0.5ml ずつ入れ 2-3 時間、25°C で静置。
- 3) ウェル内の 10xAS を除去。各希釈系列のレジオネラ属菌試験液を 0.1ml ずつ、縦列に 10 個のウェルに加える。横列は希釈系列の濃度変化が生ずるようにする。
- 4) 希釈系列の菌液は、菌濃度測定のためにその 0.1ml を BCYE $\alpha$  培地 3 枚に接種し、35°C で 4-5 日間培養。
- 5) ビニールテープでシールし、35°C で 1 日培養。さらに各ウェルに 0.2ml ずつ 1xAS を加え 3 日間、計 4 日間培養。
- 6) ウェル内をピペッティングで穏やかに攪拌し、その 10 $\mu$ l を BCYE $\alpha$  に接種し 35°C で 5-6 日間培養。
- 7) 希釈系列の各菌濃度について培養陽性であったウェル数を合計し、培養陽性率を算出。

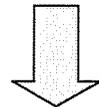
ウェルにアメーバを添加する



0.1ml  
を添加

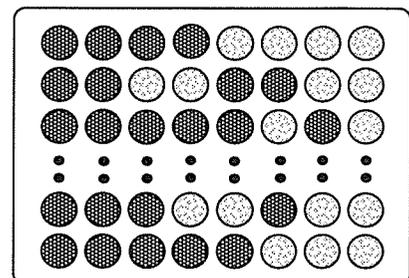


感染



各ウェルについて BCYE $\alpha$  培地で培養試験

培養陽性      培養陰性



100 100 90 80 60 20 10 0%

培養陽性率を算定

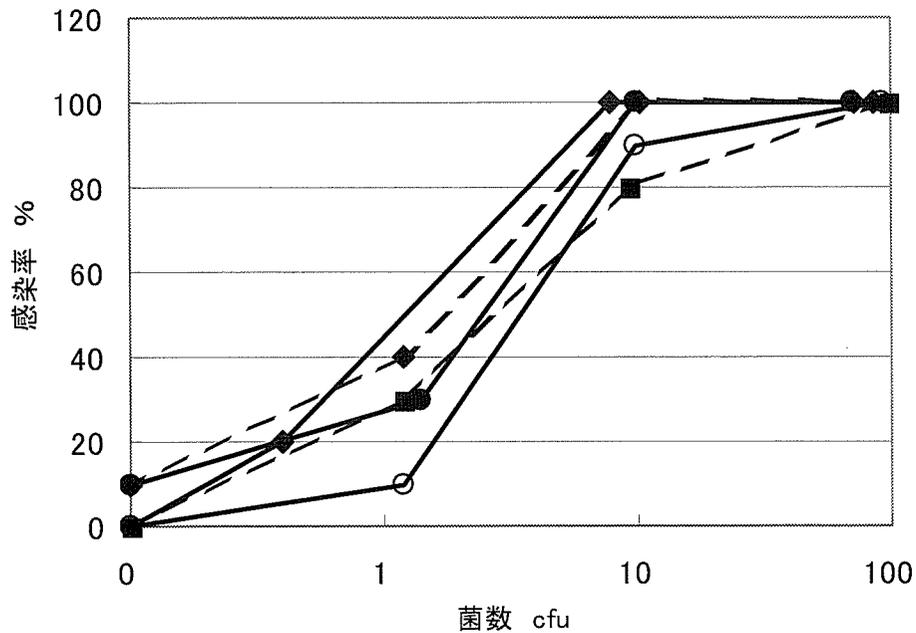


図-2、10倍希釈系列試験における菌数－感染率曲線

- ・ 縦軸はマイクロプレート法における感染率で、10ウェル中にレジオネラ属菌の増殖が認められたウェル数の割合を示す。横軸はウェルあたりの菌数を示す。
- ・ 30℃、3日間(一部4日間)BCYE α培養した菌を試験した。
- ・ 感染率は菌数依存的に低下することが示された。

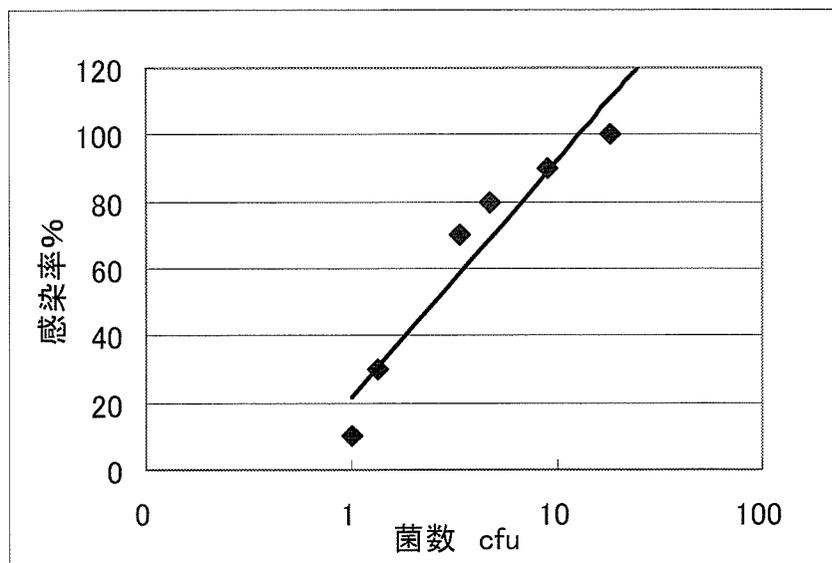


図-3、2倍希釈系列試験時における菌数－感染率曲線の一例

- ・ 30℃、3日間培養した菌を試験した。
- ・ 10倍希釈系列よりも1～10 cfuウェル間のデータ、感染率50%周辺のデータが得られている。

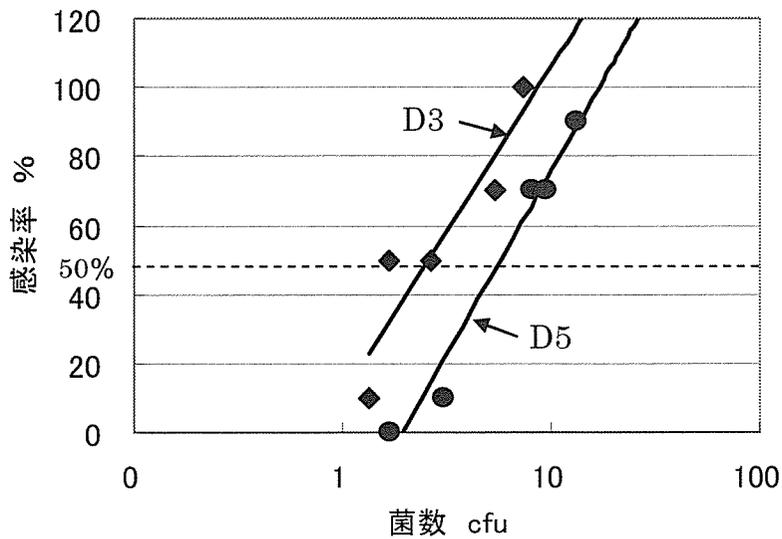


図-4、培養日数による菌数－感染率曲線の移動

同一 BCYE  $\alpha$  プレートで 30°C、3 日間 (D3) および 5 日間 (D5) 培養した菌を試験した。培養 3 日目および 5 日目の菌数－感染率曲線からそれぞれの ID<sub>50</sub> を算出したところ、5 日培養菌の ID<sub>50</sub> は有意に大きな値 (感染力の低下) を示した。

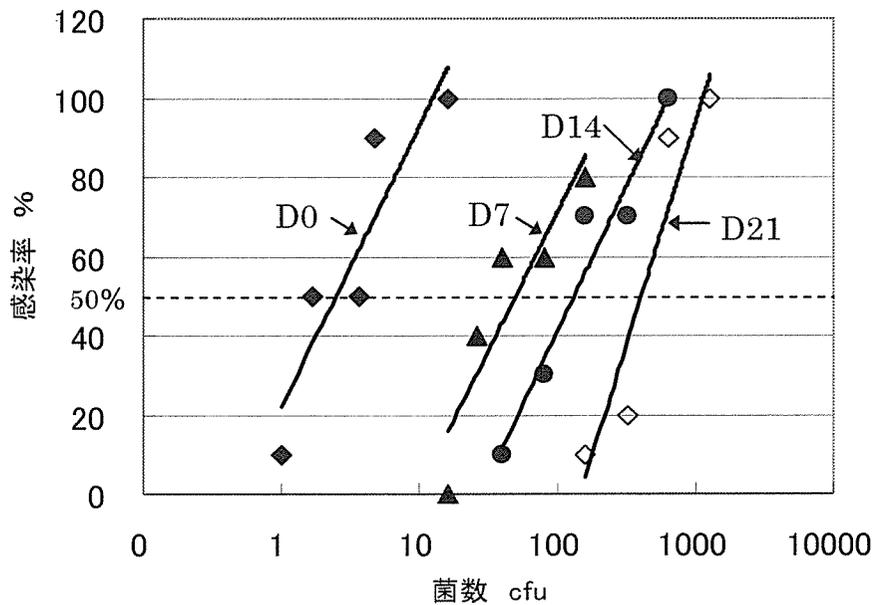


図-5、モデル浴槽水を用いた浮遊状態に置かれた菌のアメーバへの感染性の変化

BCYE  $\alpha$  プレートで 30°C、3 日間培養した菌を用い、42°C に保った脱塩素水道水 (浴槽水を想定) に浮遊状態で維持し、宿主アメーバへの感染症を測定した。その結果、ID<sub>50</sub> は継時的に大きな値をとった (右方移動)。

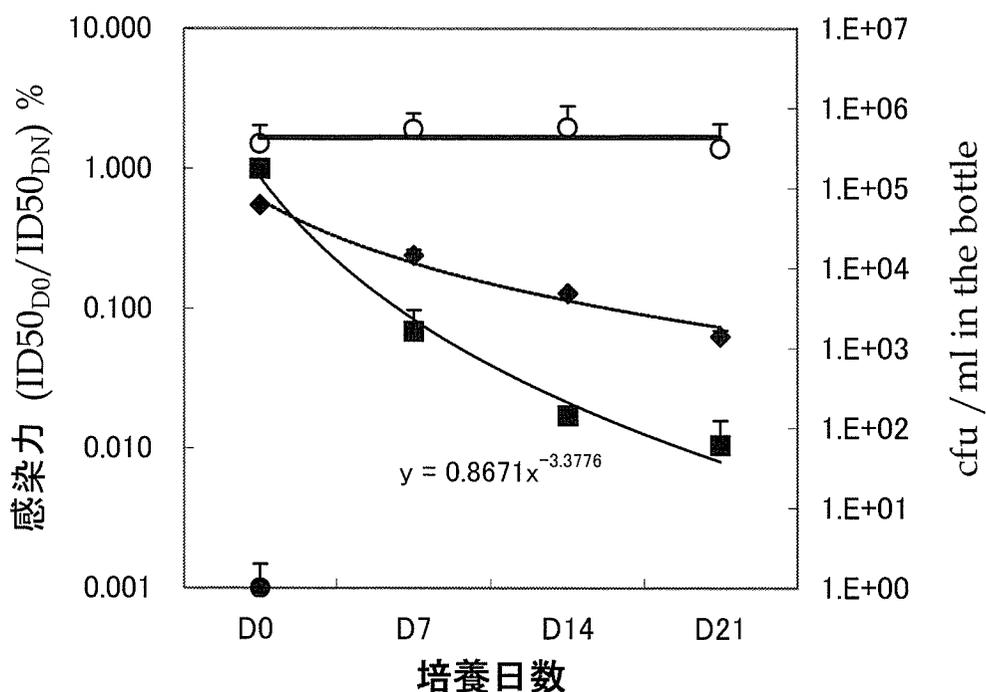


図-6 浮遊状態におかれた菌の感染力および BCYE α 培地での増殖性の変化

宿主アメーバ由来のレジオネラに比べ、BCYE α 培地由来の菌は浴槽水中に遊状態に置かれると速やかに培地での増殖性を喪失 (VNC 化) した。また、アメーバへの感染能も喪失しており、VNC 状態にあるレジオネラが宿主アメーバにより回復する現象は観察されなかった。

(左縦軸は感染力 (ID50<sub>D0</sub>/ID50<sub>DN</sub>)、右縦軸は BCYE α 培地での増殖 (CFU) を示す。横軸は培養開始後の経過日数を示す。本年度 BCYE α 培地発育菌株を用いた感染力 (ID50<sub>D0</sub>/ID50<sub>DN</sub>) を ■、本年度 BCYE α 培地発育菌株を用いた cfu を ◆ 示した。また、参考として前年度アメーバ内増殖菌株を用いた cfu の継時的推移を記載した (○)。

表一、2つの培養温度（30℃および35℃）におけるID50の算出結果

菌培養条件	試験条件	ID50 (cfu)	95%信頼限界
30℃にて3日間培養	0日	2.35	1.51-3.43
	0日	2.51	1.56-4.01
	0日	2.50	1.81-3.38
35℃にて3日間培養	0日	5.60	3.06-16.38
	0日	5.17	2.85-16.41
	0日	6.72	3.46-25.41

試験期間とは、培養後に行った試験の日数。

0日とは培養後、直ちにID50の測定を行ったことを意味する。

表二、モデル浴槽水を用いた浮遊培養試験におけるID50の変動

菌培養条件	試験条件	ID50 (cfu)	95%信頼限界
試験1 30℃にて3日間培養	42℃、0日	2.23	1.48-3.18
	42℃、4日	2.46	1.43-3.74
	42℃、7日	21.94	12.92-49.04
試験2 30℃にて3日間培養	42℃、0日	2.01	1.07-2.45
	42℃、7日	35.80	25.81-49.39
	42℃、14日	128.46	88.21-182.31
	42℃、21日	140.67	68.70-215.38
試験3 30℃にて3日間培養	42℃、0日	2.34	1.50-3.47
	42℃、7日	48.01	30.45-88.10
	42℃、14日	126.82	80.78-186.34
	42℃、21日	351.08	245.34-503.33

厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）  
分担研究報告書

循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究

浴槽水中に発生する微生物の遺伝子解析（DGGE 法）

分担研究者 泉山信司（国立感染症研究所寄生動物部）  
研究協力者 関根 寛（国立感染症研究所寄生動物部）  
田栗利紹（長崎県衛生公害研究所）  
分担研究者 福井 学（北海道大学低温科学研究所）

研究要旨

浴場施設におけるレジオネラ属菌の集団感染を受け、現在の浴槽は塩素消毒の徹底が指導されている。本来浴槽は物理洗浄を徹底することが基本であるが、営業時間の拡大に伴って浴槽水が継続的に使用され、結果的に微生物とレジオネラ属菌の制御が困難な状況を生み出している。循環式浴槽における微生物叢の実態はよく知られていない。本計画では浴槽中の細菌叢を明らかにすることを目的として、PCR-DGGE 法による解析を行った。試料は循環式浴槽の浴槽水、源泉タンク、貯湯槽より得た。PCR-DGGE は常法に準じたが、一部のバンドは複数の配列が重なり配列決定が困難であったことから、個々のバンドに対して 518R プライマーを用いた Nested-PCR の後に DGGE で分離し、塩基配列を決定した。

源泉タンクと貯湯タンクから得た DGGE バンドパターンは共通性が認められたが、浴槽水のバンドパターンは換水頻度等の管理状況を反映して源泉等との間に共通のバンドパターンを示す場合と示さない場合があった。すなわち、頻回の換水が行われている浴槽では源泉タンク貯湯タンクと共通のバンドパターンが現れ、換水頻度が低い場合は浴槽独自のバンドパターンが現れた。施設間でのバンドパターンの比較から、共通性が低く、それぞれ固有の微生物叢が観察された。

塩基配列解析によると、その多くが環境細菌に近似の配列であったが、一部病原細菌と相同性のある配列が存在し、ある浴槽水のバンドからは 550/550bp、*Legionella pneumophila pneumophila* str. Philadelphia 1 (AE017354) と完全に一致する配列が得られた。ちなみに、この浴槽の培養試験では同じ循環系の別の浴槽 (20cfu/100ml)、源泉タンク (660cfu/100ml) ならびに貯湯タンク (590cfu/100ml) からレジオネラ属菌が検出された。レジオネラ属菌培養試験で 3,080cfu/100ml が検出された別の浴槽水からは *Tepidimonas* 属菌に類似の配列が得られており、日和見感染菌との関係に注意が必要と考えられた。

## A. 研究目的

循環式浴槽は浴槽水の循環再利用による熱と水の節約、並びに利用者への便宜としての 24 時間の連続使用を宣伝文句として多くの浴場施設に導入された。ところが、浴槽水が 42°C 付近に維持された状態であることから、微生物汚染が進行して結果としてレジオネラ属菌の汚染に繋がっている。これを受けて、緊急避難的な措置として塩素消毒の徹底が指導されている。

循環式浴槽では長い循環配管とろ過層が存在し、浴槽水の 1 週間におよぶ連続使用の結果、有機物の蓄積（バイオフィームの発生）と微生物汚染が進行することから、給湯水中と浴槽水中の細菌叢は質的に異なると予想される。当該研究では浴槽中の微生物叢の動態を明らかにするための基礎資料の収集を目的として、PCR-DGGE 法を用いた細菌叢の解析を実施した。

## B. 方法

長崎県内の施設より取得した循環式浴槽水等の濃縮試料 14 検体（表 1）を DGGE 解析に供した。濃縮物（沈さ）に対して 20mg/ml の Lysozyme を添加し、40°C で 15 分間の溶解処理後、0.2mg/ml の Proteinase K と、0.15M NaCl、0.1 % TritonX-100 を含む TE 緩衝液を添加し、60°C で 30 分間溶解処理を行った。溶解後は PMSF を 0.1mM となるよう添加し、これを鋳型 DNA とした。レジオネラ属菌の測定は定法に従い、0.2µm のフィルターを用いて 500ml を 5ml に濃縮した試料より、1ml を酸処理あるいは熱処理を加え、MWY あるいは GVPC 培地上で 7 日から 10 日間 37°C 培養した。血清群の型別はスライド凝集反

応を行なった（デンカ生研）。

PCR-DGGE 法（denaturing gradient gel electrophoresis: 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）は Muyzer ら（1995）の方法に従った。すなわち、PCR プライマーに原核生物の 16S rRNA の一部領域を標的とした GC クランプ付きの GC-341F（5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG - 3'）並びに 907R（5'- CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT - 3'、R=A or G）を用いた。アンダーラインで示した GC クランプは、DGGE 泳動の際に 2 本鎖 DNA が 1 本鎖 DNA に完全解離して流れ去ることのない様に付加された配列である。PCR は Ex Taq Hot Start version（Takara）を使用し、Ex Taq Buffer（10µl）、0.2mM each dNTP Mixture、250µM Forward・Reverse Primer、2.5U Ex Taq 酵素、鋳型 DNA 1µl を含む 50µl の反応液で行った。PCR のプログラムはタッチダウン PCR とし、65°C から 55°C まで 1 サイクル毎にアニール温度を 0.5°C 低下させた。サイクル数は良好な増幅産物が得られるように鋳型量に合わせて計 30 サイクルから 40 サイクルの間で調整した。PCR 産物は 2% アガロースで電気泳動を行い、増幅を確認した。DGGE には D-Code システム（BioRad）を用いた。ポリアクリルアミドゲルの濃度は 6% で、ホルムアミド濃度勾配は 30 から 70% とした。泳動条件は 1×TAE 緩衝液（BioRad）中で 60°C、60V 定電圧とし、13 時間泳動した。泳動マーカーとしてレジオネラ属菌（*Legionella pneumophila* SG1 環境分離株）、並びに温泉細菌用マーカー（某温泉水から分離作成したもの）を使用した。泳動後は

1×SYBRGold を用いて染色後、VisiBlue トランスイルミネーターで観察・撮影を行った。得られたバンドは必要に応じて個々に解析を行った。すなわちバンドを火炎滅菌したマチ針で刺し、TE 緩衝液 50 μl を入れた PCR チューブに付着した DNA を懸濁させ、これを鋳型に PCR を行い再増幅した。再増幅の PCR プログラムは同様にタッチダウン PCR とし、サイクル数を 27 サイクルとした。再増幅産物は単一のバンドになったことを DGGE で確認後、直接塩基配列決定を行った。

塩基配列決定では、ABI PRISM BigDye Terminator V1.1 (Applied Biosystems) ならびに ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を使用した。PCR 産物は QIAquick PCR purification キット (Qiagen) を用いて残留プライマーを除去した。塩基配列決定用のプライマーには 341F の 3' 末より 20 残基と、907R を用い、両鎖の配列を取得した。得られた塩基配列は Blast 検索により DDBJ/GenBank/EMBL に登録されている

既存の塩基配列との比較を行った。アライメントの作成は PileUp (GCG Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys) を使用した。系統樹の作成は MEGA2 (Version 2.1, Kumar et al., 2001) を用いて近接結合法 (NJ 法) で行なった。

なお、上記プライマーを使用しての DGGE 解析において、複数の配列が重なりバンドの単離 (塩基配列決定) が困難であったものについては、GC-341F-20 (5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC - 3') 並びに 518R (5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG - 3') プライマーを用いた Nested PCR を行い、V3 領域 (約 200bp) に解析領域を限定して再泳動を行った。DGGE の条件はポリアクリルアミドゲルの濃度を 8%、ホルムアミド濃度勾配を 20 から 60% とした。泳動条件は 1×TAE 緩衝液 (BioRad) 中で 60°C、200V 定電圧とし、4 時間泳動した。単一のバンドになるまで増幅と泳動を繰り返し、同様に直接塩基配列決定を行った。

表 1 DGGE 解析に供した検体一覧

施設番号	検体番号	実施年	浴槽の種類	水温 (°C)	pH	残留塩素 (mg/L)	給湯の種類	レジオネラ属菌 (CFU/100mL)
1	10	平成 14 年	源泉タンク水	31.0	8.9	ND	温泉	660
	11		貯湯タンク水	44.0	8.7	ND		590
	12		男湯浴槽水	40.0	8.8	1.1		ND
	13		女湯浴槽水	39.4	9.0	1.3		280
2	14	平成 18 年	浴槽水	ND	8.0	1.2	水道水	30
3	15	平成 18 年	浴槽水	ND	7.2	0.25	水道水	ND
4	16	平成 18 年	浴槽水	ND	8.4	1.2	水道水	20
5	17	平成 18 年	浴槽水	ND	7.4	0.25	水道水	70
6	18	平成 18 年	浴槽水	ND	7.2	1.0	水道水	ND

7	19	平成 18 年	浴槽水	ND	8.5	0.0	温泉	3,080
8	20	平成 18 年	浴槽水	ND	7.4	0.5	水道水	ND
9	21	平成 18 年	源泉タンク水	ND	7.8	ND	温泉	ND
	22		貯湯タンク水	ND	8.0	ND		雑菌同定不能
	28		浴槽水	ND	8.4	0.6		80

### C. 結果および考察

各温泉試料の DGGE 法による電気泳動像を図 1 に示した。源泉タンクと貯湯タンクから得た DGGE バンドパターンは共通性が認められた（レーン 10 と 11、レーン 21 と 22）。レーン 28 の浴槽水は源泉タンク（レーン 21）並びに貯湯タンク（レーン 22）と共通のバンドパターンを示した。当該施設ではレジオネラ属菌の発生に苦慮していたことから対策に努めており、換水が頻回行われていた模様で結果として浴槽水と貯湯タンク等の共通性が高くなったと考えられた。一方、別施設では貯湯タンクと浴槽のパターンは全く異なっていた（レーン 10 と 11 に対して 12 と 13）。後者は浴槽を介したレジオネラ症の集団発生直後の試料で、当時の管理状況（換水が行われていない状況）が反映されたものと考えられた。施設間で浴槽水を比較した結果、それぞれに異なったバンドパターンが示され（レーン 14～20）、浴槽に共通した微生物種は認められなかった。

レーン 10～13、21、22、28 について全てのバンドの塩基配列を、レーン 14～20 については主要バンドの塩基配列を決定した。計 75 バンドのうち、40 バンドは配列（341F-907R 領域）が取得できた。残り 35 バンドは複数の配列の重なりにより配列決定ができなかった。そこで、341F-518R 領域の Nested PCR により個々のバ

ンドの再増幅を行い、再 DGGE 分離を行った（図 2）。その結果前述の 40 配列を含む、計 123 配列を取得した。

個々のバンドの塩基配列はその多くが環境細菌に近似の配列であったが、一部病原細菌と相同性のある配列が存在し、レーン 12 のバンド 1（図 1）からは 1976 年の米国フィラデルフィアでの集団感染株と完全一致の配列が得られた（550/550bp、*Legionella pneumophila pneumophila* str. Philadelphia 1、AE017354）。ちなみに、この浴槽水の培養試験はレジオネラ属菌が陰性（< 10cfu/100ml）であったが（表 1）、塩素消毒がなされていたこと（残留塩素 1.1mg/L）、同じ循環系の別の浴槽（20cfu/100ml）、源泉タンク（660cfu/100ml）、貯湯タンク（590cfu/100ml）ではレジオネラ属菌が培養陽性であったことから、多量の死菌が存在していたものと考えられた。この他に、レーン 12 のバンド 2、レーン 13 のバンド 1 は *Legionella* 属菌の遺伝子配列であることが確認された。

レーン 19 のバンド 10 は *Tepidimonas* 属菌類の配列と高い相同性を持つもので、場合によっては日和見感染菌が含まれる可能性がある。その他に、*Clostridium*、*Mycobacterium*、*Staphylococcus* の配列も得られたが、いずれも病原種との関連性は不明である。

得られた塩基配列のアライメントについ

て、341F-907R 領域を取得した分を図 3a に、341F-518R 領域を取得した分を図 3b に示した。Blast 検索の結果より、相同性の高い配列の候補と一致度を抜粋し、表 3 に示した。16SrRNA V3 領域 (341F-518R 領域) の配列より作成した分子系統樹を図 4 に示した。系統樹解析では浴槽水にのみ出現するクラスター、貯湯槽に強く出現するクラスター、両方に出現するクラスターに大別されたが、汚れの指標となる菌種 (群) の選別には至らなかった。

#### D. 結論

循環式浴槽における細菌叢は浴槽毎に異なりバンドパターンが共通ではなかったが、環境細菌由来の近似した配列が得られ、系統樹解析で浴槽水に共通のクラスターが認められた。ある浴槽水から *Legionella* 属菌のバンドが認められ、高濃度の汚染に達していたことが危惧された。塩素消毒下における循環式浴槽のレ

ジオネラ属菌の管理には核酸試験法が重要になると考えられた。いずれの試料でも豊かな細菌叢を呈しており、微生物汚染は深刻であったと考えられた。

#### E. 参考文献

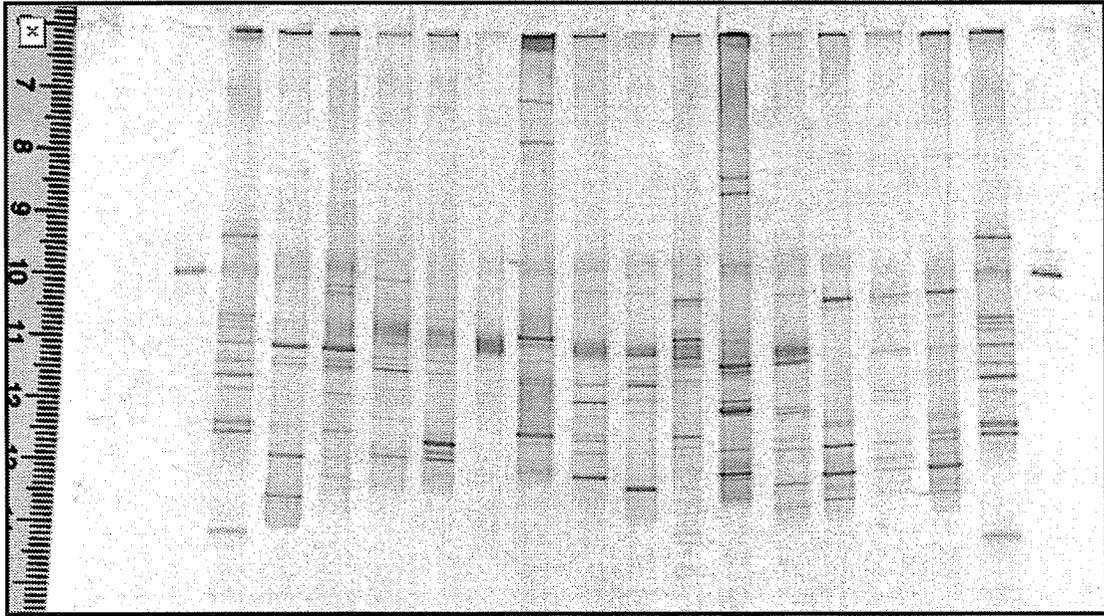
遠藤卓郎他、PCR-DGGE 法による掛け流し式浴槽等環境中の細菌叢の解析、厚生労働科学研究費補助金 (地域健康危機管理研究事業)「掛け流し式温泉における適切な衛生管理手法の開発等に関する研究 (主任研究者：井上博雄)」より平成 18 年度分担研究報告書

#### F. 研究発表

- (ア) 論文発表 なし
- (イ) 学会発表 なし

#### G. 知的所有権の取得状況

- (ア) 特許取得 なし
- (イ) 実用新案登録 なし



※左右それぞれ2レーンはレジオネラ属菌と温泉細菌用マーカー

図1 DGGE法による電気泳動像（循環式浴槽水等の試料）

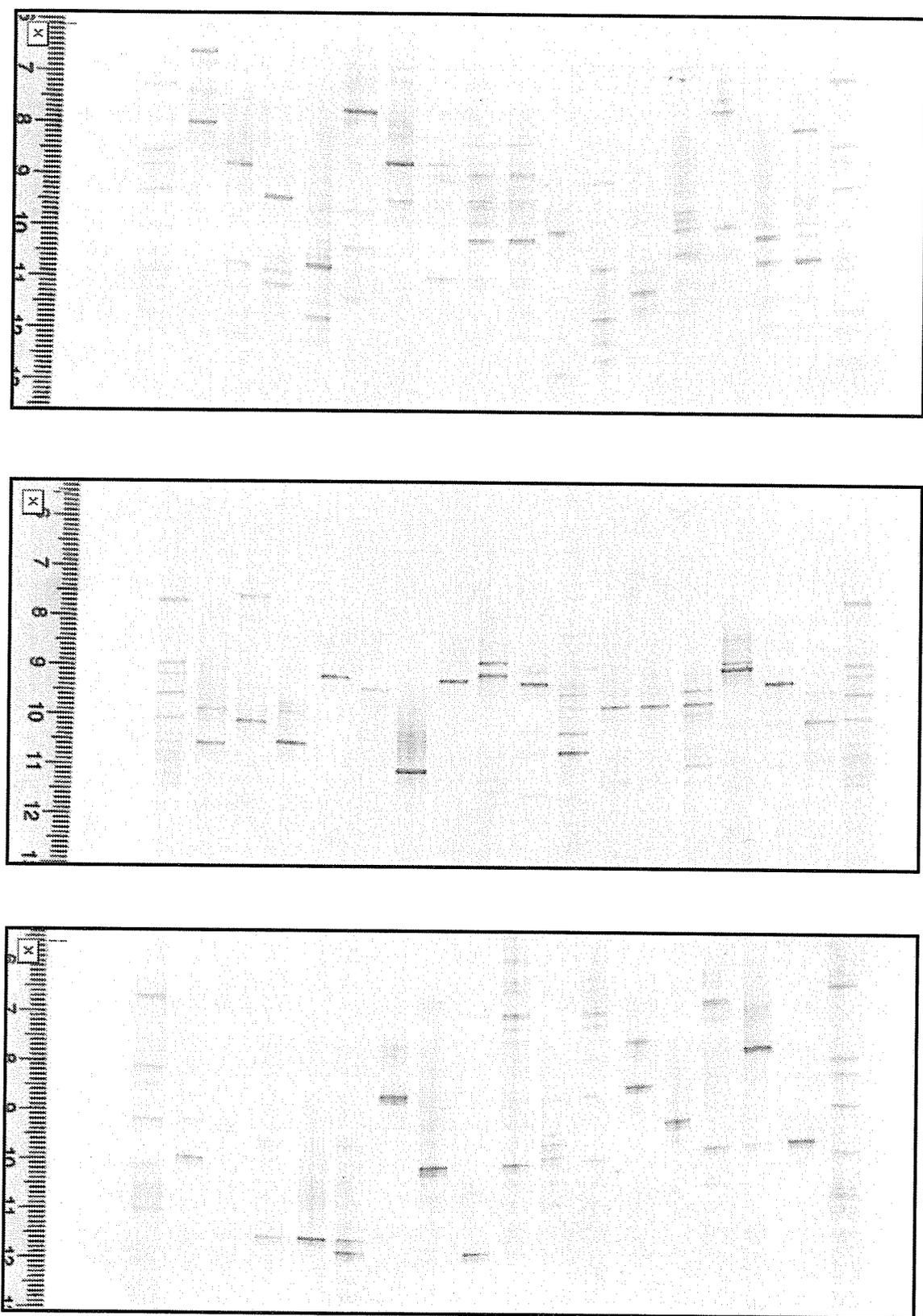


図2 Nested PCR 後の DGGE 法による泳動像



na10-1	: GG-TTGAATA	TGA	ATTAAGCAT	CGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGCT-AAAT	: 232
na11-1	: GG-TTGAATA	TGA	ATTAAGCAT	CGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGCT-AAAT	: 232
na19-3	: GGCCTGAGCTA	AGAG	ATTAAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGCT-AAAT	: 232
na11-2	: - -TTGATGATA	TCAAG	ATTAAG	ATCGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGCT-AAAT	: 231
na21-1	: TGTTTGATTA	CTC	GAAAG	CGGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGCT-AA-AC	: 232
na22-1	: TGTTTGATTA	CTC	GAAAG	CGGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGCT-AA-AC	: 232
na28-1	: TGTTTGATTA	CTC	GAAAG	CGGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGCT-AA-AC	: 176
na11-3-2	: TGTGGGAGCTA	ATG	AGAG	ATCGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGCT-AA-AC	: 229
na21-4	: TGGATGAGCTA	TGC	AGAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGCT-AA	: 237
na22-7-2	: TGGATGAGCTA	TGC	AGAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGCT-AA	: 174
na28-9	: TGGATGAGCTA	TGC	AGAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGCT-AA	: 237
na21-5	: TGGATGAGCTA	TGC	AGAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGCT-AA	: 171
na16-6	: CTGATGAGCTA	TGA	ATTAAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GG-TTATGC	: 197
na19-10	: CTGATGAGCTA	GTA	ATTAAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GG-TTATGC	: 196
na19-8	: GGGATGAGCTA	GGG	ATTAAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GG-TTATGC	: 196
na11-8	: GGGATGAGCTA	TGA	ATTAAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GG-TTATGC	: 237
na10-3	: CTAATGAGCTA	AGAG	ATTAAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GG-TTATGC	: 237
na21-3	: CTAATGAGCTA	TGA	ATTAAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GG-TTATGC	: 185
na28-2	: AGGCTGAGCTA	TTG	AGAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GG-TTATGC	: 201
na12-1	: AACTGGAGCTA	CAC	AGAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GG-TTATGC	: 237
na19-5	: - - -TGAATA	GGG	ATTAAG	TGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCTACT-C	: 177
na20-3	: - - -TGAATA	GGG	ATTAAG	TGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCTACT-C	: 177
na15-3	: - - -TGAATA	GGG	ATTAAG	TGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCTACT-C	: 172
na18-3	: - - -TGAATA	GGG	ATTAAG	TGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCTACT-C	: 173
na12-8	: - - -TGAATA	TGG	ATTAAG	CGGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCTACT-C	: 212
na13-7	: - - -TGAATA	TGG	ATTAAG	CGGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCTACT-C	: 212
na12-7	: - - -TGAATA	TGG	ATTAAG	CGGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCTACT-C	: 212
na15-8	: - - -TGAATA	GGG	ATTAAG	CGGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCTACT-C	: 212
na13-5	: - - -TGAATA	GGG	ATTAAG	CGGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCTACT-C	: 212
na17-12	: - - -TGAATA	GGG	ATTAAG	CGGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCTACT-C	: 187
na14-1	: AAT-GAGCTA	AGC	GGAG	ATCGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCTACT-C	: 215
na16-4	: AAT-GAGCTA	AGC	GGAG	ATCGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCTACT-C	: 215
na12-3-2	: AAT-GAGCTA	AGC	GGAG	ATCGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCTACT-C	: 173
na13-3	: AAT-GAGCTA	AGC	GGAG	ATCGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCTACT-C	: 214
na12-6	: AATG-GAGCTA	AACT	GGAG	TTCGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGATCG-T	: 213
na13-4	: AATG-GAGCTA	AACT	GGAG	TTCGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGATCG-T	: 126
na10-4	: AATC-GAGCTA	CACT	GGAG	TTCGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGATCG-T	: 213
na10-8	: CAAGTGAAGCTA	TGC	AGAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGATCG-T	: 217
na16-11	: TGAGTGAAGCTA	TAC	AGAG	ACGGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGGATCG-T	: 217
na18-1	: - -AATGAGCTA	ATT	TAAG	GTCCGC	AACT	CGTGGCAGCAGCCGGGGTAA	ACGGAGGAT	CGAGCGTTT	ATCCGGATTTCA	TGGGTT	TAAAGCGTCCGGAGG	GGCA-AATC	: 185

図 3a 当該研究で取得した GC341F-907R 領域配列のアライメント (続き)

na10-1	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	TTAGTCTGA	TTAATTT	GTCGGCC	GAACTAGCA	CTAGCGTG	AATCA	AGA	350
na11-1	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	TTAGTCTGA	TTAATTT	GTCGGCC	GAACTAGCA	CTAGCGTG	AATCA	AGA	350
na19-3	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	TTAGTCTGA	TTAATTT	GTCGGCC	GAACTAGCA	CTAGCGTG	AATCA	AGA	350
na11-2	GTGAAT	AAAGGAGTGG	GAACGAT	TAG	TTCATAC	GTTTCTTGA	AGTATG	GTCAGAG	GAAAGTGA	AGTGGTG	AATCA	AGA	348
na21-1	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTAAAC	TTAATCTGA	GGCA	GAGAGAC	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	350
na22-1	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTAAAC	TTAATCTGA	GGCA	GAGAGAC	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	350
na28-1	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTAAAC	TTAATCTGA	GGCA	GAGAGAC	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	294
na11-3-2	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	347
na21-4	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	355
na22-7-2	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	292
na28-9	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	289
na21-5	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	289
na16-6	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	315
na19-10	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	314
na19-8	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	314
na11-8	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	355
na10-3	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	355
na21-3	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	303
na28-2	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	319
na12-1	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	355
na19-5	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	295
na20-3	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	295
na15-3	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	290
na18-3	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	330
na12-8	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	291
na13-7	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	330
na12-7	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	330
na15-8	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	330
na13-5	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	330
na17-12	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	305
na14-1	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	333
na16-4	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	333
na12-3-2	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	291
na13-3	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	332
na12-6	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	331
na13-4	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	244
na10-4	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	331
na10-8	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	335
na16-11	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	335
na18-1	GTATGGGTTG	AAATCCAGGGCT	AACTCTGG	GCCT	CTTATAC	CCGTTCTGA	GGGAG	GTCAGAG	GAACTAG	CTAGCGTG	AATCA	AGA	308

図 3a 当該研究で取得した GC341F-907R 領域配列のアライメント (続き)

na10-1	: AGAA ACCGA AGCG AGGCAGCTCA CAAGTTATA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 470
na11-1	: AGAA ACCGA AGCG AGGCAGCTCA CAAGTTATA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 470
na19-3	: AGAA ACCGA TCGG AGGCAGTTTA ACGGAAT	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGACA	: 470
na21-1	: AGAA ACCGA TCGG AGGCAGTTCTT TCGTT	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 468
na22-1	: AGAA ACCGA TCGG AGGCAGTTCTT TCGTT	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 470
na28-1	: AGAA ACCGA TCGG AGGCAGTTCTT TCGTT	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 470
na11-3-2	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 414
na21-4	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 467
na22-7-2	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 475
na28-9	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 412
na21-5	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 475
na16-6	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 409
na19-10	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 435
na11-8	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 434
na10-3	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 434
na21-3	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 475
na28-2	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 475
na12-1	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 423
na19-5	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 475
na20-3	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 415
na15-3	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 415
na18-3	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 410
na12-8	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 411
na13-7	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 450
na12-7	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 450
na15-8	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 450
na13-5	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 450
na17-12	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 425
na14-1	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 453
na16-4	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 453
na12-3-2	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 411
na13-3	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 452
na12-6	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 451
na13-4	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 364
na10-4	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 451
na10-8	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 455
na16-11	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 455
na18-1	: AGAA ACCGA GCG AGGCAGTTCTT CTGCA	TGAC CTCATGCACGAAAG	GGGATC	GGATTAGATACCC	GFAGTCC	CTCTAAAGG	TGATC	CGTT	: 423

図 3a 当該研究で取得した GC341F-907R 領域配列のアライメント (続き)

```

na10-1 : TGGCGATA-CACAG-...-CA-CCGTA-...-ATGATAAGT-GATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 541
na11-1 : TGGCGATA-CACAG-...-CA-CHTA-...-ATGATAAGT-GATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 541
na19-3 : TAA-CGATAATTACAG-...-TACGGT-TA-...-CATTAAGTAAATCCACCT- GGGAAATACGACCGCAAGGTTG : 542
na11-2 : TCC-C-CTGTATAGG-...-GA-CC-TA-...-A-CGATAAGTAAACCACCT- GGGAGTACGACCGCAAGGTTG : 539
na21-1 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 541
na22-1 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 541
na28-1 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 455
na11-3-2 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 540
na21-4 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 550
na22-7-2 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 464
na28-9 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 550
na21-5 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 425
na16-6 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 474
na19-10 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 470
na19-8 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 476
na11-8 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 481
na10-3 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 550
na21-3 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 446
na28-2 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 482
na12-1 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 550
na19-5 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 449
na20-3 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 449
na15-3 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 485
na18-3 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 461
na12-8 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 523
na13-7 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 523
na12-7 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 523
na15-8 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 523
na13-5 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 486
na17-12 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 461
na14-1 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 528
na16-4 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 528
na12-3-2 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 455
na13-3 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 524
na12-6 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 526
na13-4 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 383
na10-4 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 526
na10-8 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 530
na16-11 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 531
na18-1 : TTT-GTGCCTTTGC-A-...-CA-CC-TT-...-CGATTAAGTAAATCCACCT- GGGAGTACGATCGCAAGGTTG : 477

```

図 3a 当該研究で取得した GC341F-907R 領域配列のアライメント (続き)