

II 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）
温泉の泉質等に応じた適切な衛生管理手法の開発に関する研究

平成18年度分担研究報告

温泉水の微生物に対する作用

分担研究者 藤田雅弘（群馬県衛生環境研究所保健科学グループ）
研究協力者 星野利得（群馬県衛生環境研究所保健科学グループ）
丸山和美（群馬県衛生環境研究所保健科学グループ）
堀越壮一（群馬県衛生環境研究所水環境・温泉研究センター）
山口貴史（群馬県衛生環境研究所水環境・温泉研究センター）
菱田隆人（株式会社ヤマト 大和環境技術研究所）

研究概要

温泉施設でのレジオネラ症の発生が増加していることから、温泉施設の衛生確保のため、浴槽水の水質基準として *Legionella pneumophila*(以下、Lp)が浴槽水 100ml 中に検出されないことが管理目標数値として規定されている。温泉の泉質によっては、酸性泉では、浴槽水の消毒に次亜塩素酸ナトリウム等の薬品を用いると塩素ガスが発生し、このような消毒方法は適当でないと考えられる。本県では、酸性泉を利用源泉とする掛け流し式温泉の利用水の Lp に対する作用について調べた。酸性泉を利用する施設の浴槽水に Lp を接触させた場合、直には菌数の減少はみられないが、60 分間経過後には菌数が減少した。また、大腸菌についても同様に減少した。酸性泉を源泉とする浴槽水は、Lp 及び大腸菌に殺菌効果を有すると考えられた。

浴槽水に含まれる様々なイオンの殺菌効果を調べる目的で、浴槽水のイオン交換処理をおこなった。陰イオン交換処理しない酸性泉は、一定時間経過後に菌数が減少したが、陰イオン交換処理をおこなうと菌数の減少がまったくみられなかった。陽イオン交換処理を行った場合には菌数の減少がみられた。これは、陽イオン交換後に、水素イオン濃度が増加したことが菌数の減少に影響していると考えられた。

イオン交換処理した水溶液に、ヨウ素水溶液及びマンガン水溶液をそれぞれ添加したところ、菌数の減少がみられた。陰イオン交換処理により、Lp に対する殺菌効果はなくなり、ヨウ素イオン濃度及びマンガンイオン濃度をほぼ元に戻すと殺菌効果は復元した。水溶液中にマンガンイオンが存在しない条件下では、

2.0mg/Lのヨウ素イオン濃度でLpは減少した。ヨウ素イオンが存在しない条件下では、マンガン濃度をあげても、菌数の減少は著しくなかった。酸性水溶液である硫酸水溶液(pH2.2)では菌数の減少がみられるが、pH3.3では菌数の減少はみられなかった。Lpに対しては、ヨウ素イオンの存在により殺菌効果がもたらされ、pH3未満の酸性泉の場合には、水素イオンの濃度も殺菌効果に影響を与えると考えられた。酸性泉のLpが宿主とするアメーバのシストへの影響をみると、60分間接触させてもアメーバシストのシスト数は減少しなかった。また、NN培地を用いたMPN値(最確数)も減少しないことから、今回用いた酸性泉は、宿主アメーバシストに対して殺滅効果を示さなかった。酸性泉を利用する掛け流し式温泉施設での浴槽水の消毒は必要ないと考えられるが、浴場及びその付帯設備の衛生管理及び維持管理について注意し、潜在的な危害を排除する努力は必要であると考えられた。

A. 研究目的

入浴施設のレジオネラ症集団感染事例が続発し、平成15年に公衆浴場における衛生管理要領等が改正された。循環式浴槽では、浴槽水の消毒方法が明記されLpの規制が徹底された。一方では、掛け流し式温泉については、泉質により塩素消毒が行えない場合があり、安全性の確保がはかられているのか不確定な要因がある。

厚生労働省が示している「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」によれば、酸性泉にはレジオネラは棲息しないとの記述や、「レジオネラの知識と浴室管理」では、酸性域(PH5.0以下)ではLpが棲息しにくいと記述されている。

本県では、温泉施設でのレジオネラ症の発生が増加していることから、温泉施設の衛生確保のため、県旅館業条例および公衆浴場法施行条例を改正した。浴槽水の水質基準としてLpが検出されないことを管理目標数値と規定している。温泉泉質によっては、管理目標数値を達成するために、浴槽水の水質検査義務を一律に課すことは妥当でないと考えられる。本県では酸性泉を

利用する掛け流し式温泉での、浴槽水の水質検査義務の適用除外を検討する一助としてLpに対する酸性泉の作用について調べた。

B. 研究方法

(1) 温泉水の殺菌効果

微生物の添加試験に使用した温泉水は、本県内の酸性泉であるK温泉およびM温泉の酸性・(含硫黄)一硫酸塩泉を利用している6施設の浴槽水及びその源泉を採水した。冷蔵保存し、使用毎に0.22μmのミリポアフィルターで濾過滅菌し使用した。使用した浴槽水の水質のpHの平均値は2.5±0.5であった。K温泉のヨウ素イオン濃度は1.6±0.2mg/L、マンガンイオン濃度は2.1±0.1mg/Lであった。また、M温泉のヨウ素イオン濃度は0.3±0.1mg/L、マンガンイオン濃度は4.0±0.7mg/Lであった。使用した菌は、*Legionella pneumophila* SG1(ATCC33153)(以下、Lp)及び*Escherichia coli*(ATCC8739)(以下、Ec)を使用した。LpはGVPC培地(ビオリュエ)で37℃3日間培養し、発育した集落を掻き取り滅菌蒸留水に浮遊させ菌液を作成した。

適宜希釈し温泉水に加え、42°Cで静置し培養後に、経時的にPBS (pH7.4)で段階希釈した。0.1mlをGVPC培地に塗抹し37°C3日間培養し生じるコロニー数を測定した。Ecは、Lpと同様に処理し、分離培地としてDHL(栄研化学)を用いて37°C24時間培養した。

(2) イオン交換処理後の温泉水の効果

K温泉3施設の浴槽水、M温泉3施設の浴槽水をイオン交換処理し、Lpの添加試験を行った。温泉水をイオン交換カラム(SUPELCO)であるDSC-SCX(カチオン)及びDSC-SAX(アニオン)を使用した。カラムを脱イオン水でコンディショニング後に、流速約1ml/minで通過させイオン交換を行った。処理水にLpの菌液を添加し、10分間及び30分間、42°C静置した後、PBS (pH7.4)で段階希釈した。その0.1mlをGVPC培地に塗抹し37°C3日間培養し生じるコロニー数を測定した。イオン交換処理水に抗菌活性のあるイオン濃度の影響をみるため、陰イオン交換水には0.5Mのヨウ素溶液(関東化学)の希釈液を、陽イオン交換水にはマンガン標準液100(関東化学)の希釈液を作成し、ほぼ温泉水の含有濃度になるように添加しLpへの殺菌効果を調べた。

(3) ヨウ素及びマンガンイオンのレジオネラへの影響

Lpへのヨウ素及びマンガンイオンの影響をみるため、PBSに0.5Mのヨウ素溶液を希釈し、1mg/L、2mg/L及び4mg/Lそれぞれ加えた溶液を作製した。また、マンガン標準液を調整し、マンガンイオン濃度が1mg/L、2mg/L及び4mg/Lとなるよう添加した溶液を作製した。これに菌液を加え、10分間及び30分間後に菌数を測定し殺菌効果を観察した。対照として、1NのH₂SO₄を希釈調整し作成したpH2.2及びpH3.3の硫酸水溶液、滅菌蒸留水及びレジオネラが検出されたI温泉水(塩

化物泉 pH6.8)を用いた。

(4) 温泉水の宿主アメーバへの効果

アメーバの温泉水に対する影響をみるため、アメーバは宿主アメーバとして代表的な*Acanthamoeba* sp.(国立感染症研究所 八木田健二博士より分与)を用いた。大腸菌を塗布したNN培地にて37°C5日間培養し、NN培地を滅菌蒸留水10mlで洗浄し、アメーバシストを回収した。10⁴ cysts/mlとなるように温泉水に添加し、42°Cで静置した後、経時的に採取し、トーマの血球計算盤でシスト数を測定した。また、シスト添加液10mlを経時的に、5枚のNN培地に1.0ml、0.1ml及び0.01mlの量を接種し、37°Cで5日間培養し、栄養体の増殖もしくはプラークの形成を観察してMPN値(Most probable number: 最確数)を求めた。

C. 結果および考察

(1) 温泉水の殺菌効果

Lpは、K温泉及びM温泉の浴槽水に接触させた場合、直に菌数の減少はみられないが、30分経過後にはK温泉水中の菌数は10⁴オーダーが10²台のオーダーに、M温泉水は10³オーダーまで減少した。また、60分経過後には、いずれの温泉水も10¹オーダーに減少した。また、Ecは30分経過後に10⁶オーダーの菌数が、K温泉水では10²に、M温泉水で10⁵未満にそれぞれ減少した。60分経過後に、K温泉水及びM温泉のいずれとも、10²までにそれぞれ減少した。また、源泉地から湧出した源泉を採取しLp及びEcへの影響を調べた。

EcはK温泉及びM温泉に接触した場合、60分後には10⁵オーダーの菌数が10³までに減少した。さらに3時間後には10²まで減少した。一方、LpはK温泉及びM温泉ともに30分経過後には10³オーダーまで減少し、60分経過後にはM温泉水は10⁴オーダーが10²

台のオーダーに、K 温泉水は 10^2 未満まで減少した。

酸性泉は、浴槽に溢水させて使用しても、源泉と同様に殺菌効果を有していた。これらのことから酸性泉を源泉とする浴槽水は、Lp 及び Ec に対して殺菌効果を有すると考えられた (図 1、図 2)。

(2) イオン交換処理後をおこなった温泉水の殺菌効果

陰イオン交換処理しない酸性泉は、30 分経過後に Lp は 10^4 オーダーから 10^2 オーダーにまで菌数が減少したが、温泉水を陰イオン交換処理した場合、30 分経過後も菌数の変化がまったくみられなかった。陽イオン交換処理をした場合、いずれの温泉水も 30 分経過後に 10^4 オーダーから 10^2 オーダーに減少した。陽イオン交換された処理水は、水素イオン濃度が増加し pH が低下したことが菌数の減少に影響していると考えられた。

陰イオン交換水に、イオン交換前に含まれるヨウ素イオン濃度にほぼ等しくなるように、ヨウ素希釈溶液を添加したところ、Lp は 30 分経過後に 10^4 オーダーが 10^1 オーダーに減少した。また、陽イオン交換水に、イオン交換前のマンガンイオン濃度にほぼ等しくなるように、マンガン標準液を添加したところ、30 分間反応後の Lp の菌数は、 10^4 台から 10^2 未満に減少した。このことから、陰イオン交換処理により、Lp に対する殺菌効果はなくなり、ヨウ素イオン濃度を元に戻すと、殺菌効果は復元すると考えられた (図 3)。

(3) ヨウ素イオン及びマンガンイオンのレジオネラに対する殺菌効果

マンガンイオンが存在しない条件下では、ヨウ素イオンを含む水溶液に Lp を加えると、2.0mg/L ヨウ素イオンの存在により 10^5 オーダーの菌数 (CFU/ml) が 10^3 となり、4mg/L では 10^2 未満となった。ヨウ素イオンが存在しない濃度 0mg/L では、マンガンイオン

濃度が上がっても 10^5 オーダーの菌数は、30 分間経過しても 10^3 台であった。対照の酸性水溶液である pH2.2 の硫酸水溶液では、30 分間経過後には 10^1 オーダーにまで減少したが、pH3.3 の硫酸水溶液では菌数の減少はみられなかった。また、滅菌蒸留水及び I 温泉水も 30 分間経過後も菌数の減少がまったくみられなかった。黄色ブドウ球菌の殺菌効果については、ヨウ素化合物とマンガンの効果により殺菌効果がもたらされるとの報告がある。しかしながら、Lp に対しては、ヨウ素イオンの存在により殺菌効果がもたらされるものの、マンガンの存在だけでは殺菌効果を、あまり示さないと考えられた。また、pH3 未満の硫酸水溶液では、Lp の菌数の減少が見られ、pH3 未満の酸性泉の場合、水素イオンの濃度も Lp の殺菌効果に影響することが考えられた (表 1)。

(4) 宿主アメーバシストに対する温泉水の影響

レジオネラ宿主であるアメーバシストの温泉水の影響をみたところ、60 分間接触させてもアメーバシストのシスト数は減少しなかった。また、NN 培地を用いて MPN 値を求めたところ、MPN 値も変化しないことから、今回用いた酸性泉は、宿主アメーバシストに対して殺滅効果を持たないと考えられた (図 4)。

D. 結論

酸性泉はレジオネラ菌の殺菌効果をもつことから、利用源泉が pH3 以下の酸性泉を利用する施設については、十分な湯量をもって従来からおこなわれている、温泉水の掛け流し方式をとっていれば、浴槽水の消毒をおこなわなくても、浴槽水のレジオネラ菌の衛生管理目標値を達成すると考えられた。

しかしながら、源泉の性質を著しく損なうような極端な加水や、循環式で連続利用することにより浴槽水の換水

頻度を減らした場合の水質の低下は避けるべきであると考えられる。湯口水及び浴槽水からは、しばしば従属栄養細菌が検出されることや、酸性泉はレジオネラ属菌の宿主アメーバシストには効果がないことから、浴室環境においてレジオネラ属菌が増殖する可能はあると考えられた。特に、温泉施設の構造をみると、浴槽の材質が木材であったり、岩石を組んだ清掃しにくい構造である施設が多くみられるため、バイオフィームが発生してレジオネラ菌の増殖する要因はあるものと考えられた。今回、酸性泉を利用する掛け流し式温泉施設では、浴槽水の消毒は必要ないと考えられたが、浴場及びその付帯設備の衛生管理及び維持管理について注意し、潜在的な危害の排除する努力は必要であると考えられた。

E. 参考文献

1. Takafumi I, Shitara I and Kazuo K. Bactericidal Activity of Manganese and Iodide Ions against *Staphylococcus aureus*: A Possible Treatment for Acute Atopic Dermatitis. *Acta. Derm. Venerol.* 1999.79.360-362.
2. Tara KB, David VS, Alan T,

Angus KM, and Anthony MG. Determination of Amoebicidal Activities of Multipurpose Contact Lens Solutions by Using a Most Probable Number Technique. *J.Clin Microbiol.* 2003. 41. 2992-3000.

3. 笹原武志、菊野理津子、曾我英久ほか.水系汚染 *Legionella* 属菌に対する感染防止対策の確立.感染症学雑誌.2004.78 巻,p22-31
4. 笹原武志、奥田舜治、菊野理津子ほか.新規殺菌セラミックによる *Legionella pneumophila* の殺菌効果に及ぼす温泉泉質の影響.感染症学雑誌.2005.79 巻,p157-160

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 各試験液のレジオネラ菌の殺菌効果
(30分間経過後)

ヨウ素イオン濃度	マンガンイオン濃度 (mg/L)				pH2.2 H ₂ SO ₄	pH3.3 H ₂ SO ₄	i 温泉水 (pH6.8)
	0	1	2	4			
0mg/L	-	-	+	+	+	-	-
1mg/L	+	++	++	++	++	++	++
2mg/L	++	++	++	++	++	++	++
4mg/L	++	++	++	++	++	++	++

++: 1/1000以上に減少

+: 1/10~1/100に減少

-: 1/10未満に減少

図1 浴槽水の細菌への影響 (n=3)

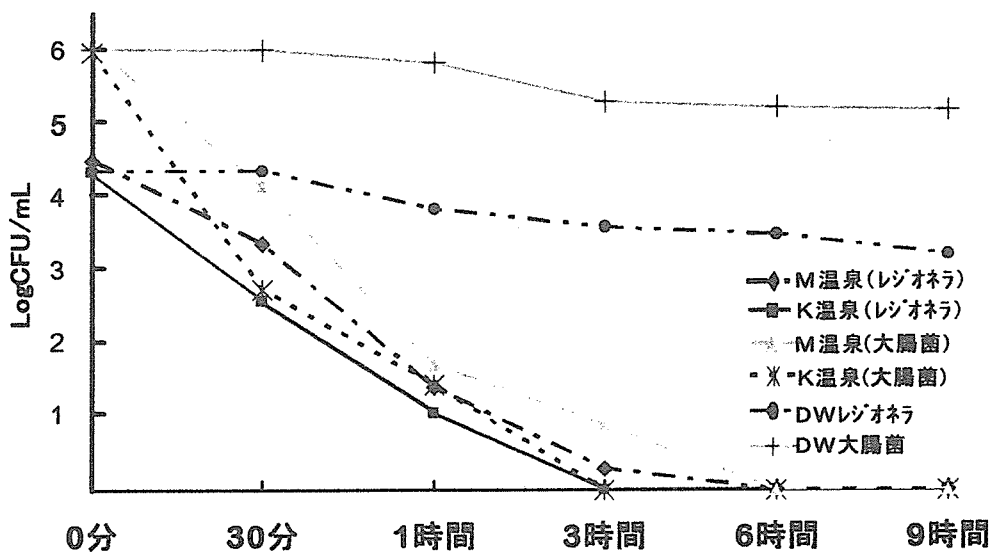


図2 源泉の細菌への影響 (n=3)

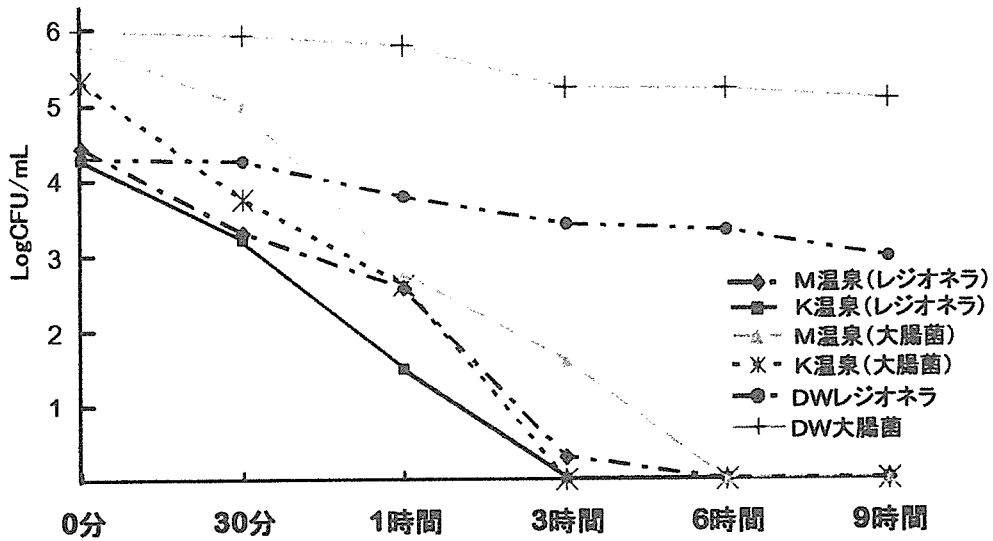


図3 イオン交換処理水のレジオネラ菌への効果 (浴槽水)

K温泉水 (n=3)

M温泉水 (n=3)

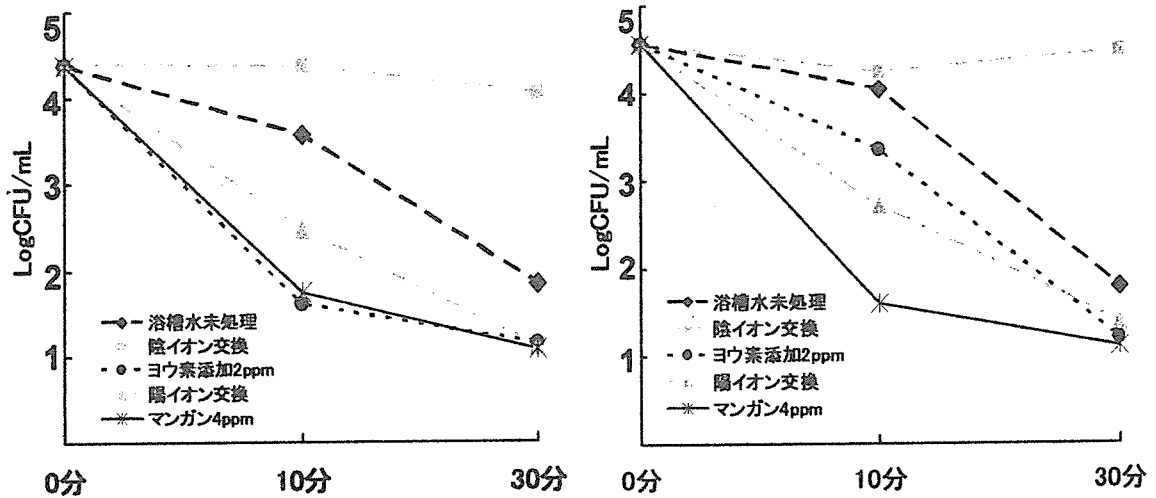
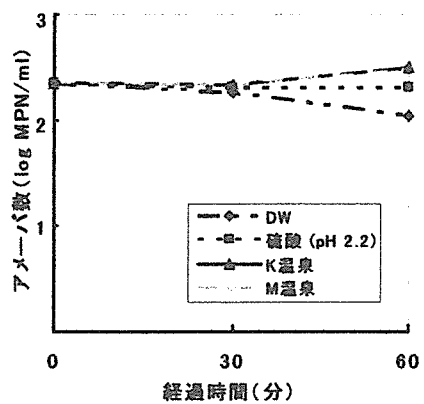
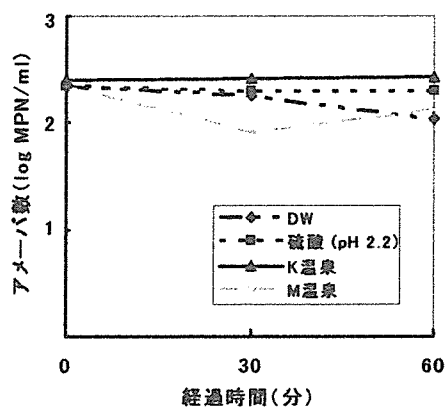


図4 温泉水のアメーバへの影響



アカンソアメーバに対する源泉水の影響



アカンソアメーバに対する浴槽水の影響

Legionella pneumophila 血清群 1 の遺伝子型
およびモノクローナル抗体型の解析

主任研究者 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部
分担研究者 前川純子 国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者 常 彬 国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者 小林静史 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨： 日本各地から分離された *Legionella pneumophila* 血清群 1 の環境分離株 27 株（入浴施設分離株 13 株、冷却塔分離株 14 株）および臨床分離株 38 株、計 65 株について遺伝子型別およびモノクローナル抗体型別を行ったところ、環境分離株は 14 種類に、臨床分離株は 29 種類に型別され、その疫学的有用性が確認できた。環境分離株において、冷却塔分離株が遺伝子型(1, 4, 3, 1, 1, 1)、モノクローナル抗体型は OLDA および Oxford と均一であったのに対し、入浴施設分離株は多様性に富んでいた。集団感染事例の 3 株を除くと、環境分離株と臨床分離株で共通の型は 2 種類のみであり、両者で遺伝子型やモノクローナル抗体型の分布や頻度が異なることが示唆された。病原性に関連すると考えられている MAb 3/1 に着目すると、臨床分離株は 74% が陽性であったのに対し、環境分離株の陽性率は 22% で、すべて入浴施設由来株であった。

A. 研究目的

わが国においてレジオネラ症の主要な感染源は温泉などの入浴施設であると推測されている。レジオネラ症の起原菌として最も頻度の高い *L. pneumophila* 血清群 (SG) 1 の分離株について、遺伝子型別およびモノクローナル抗体 (MAb) 型別を行い、その疫学的有用性を確認するとともに、本菌の生息する環境の違いにより遺伝子型や MAb 型に差が見られるか、また臨床分離株との間に違いがあるか調べることを本研究の目的とする。

B. 研究方法

日本各地から分離された *L. pneumophila* SG 1 の環境分離株 27 株（入浴施設分離株 13 株、冷却塔分離株 14 株）および臨床分離株 38 株、計 65 株を EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections) の方法 (<http://www.ewgli.org/>) に従って、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA* 遺伝子の一部の領域の塩基配列に基づく型別 (SBT) を行い、遺伝子型を決定した¹⁾。なお、*flaA* は

鞭毛(flagellin)タンパク質、*pilE* は IV 型線毛(type IV pilin)タンパク質、*asd* はスレオニン合成系酵素であるアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase)、*mip* は宿主マクロファージへの感染に寄与する (macrophage infectivity potentiator) タンパク質、*mompS* は主要外膜タンパク質 (major outer membrane protein)、*proA* は亜鉛メタロプロテアーゼ (zinc metalloprotease) をそれぞれコードする遺伝子である。また、6 種の MAb による型別²⁾をドレスデン工科大学のユージェン・ヘルビグ博士との共同研究として行った。

C. 研究結果

SBT により環境分離株 27 株は 11 種類に型別された。入浴施設分離株 13 株（3 株の集団感染事例起原菌を含む）は 10 種類に型別されたが、冷却塔分離株 14 株はすべて 1 種類の特有の型だった（表 1）。また、臨床分離株 38 株（上記 3 例の集団感染事例は含ま

ない)は26種類に型別され、冷却塔分離株と同じ型のものが6株存在した以外はきわめて多岐であった(表3参照)。わが国で初めての臨床分離株(1980年、表3、下から3行目、NIIB No. 79)は冷却塔型ではなかった。環境分離株のうち、臨床分離株と共通の型を示したのは集団感染事例で感染源からも分離された株の型[(2, 3, 9, 10, 2, 1), (6, 10, 19, 3, 19, 4)]と冷却塔分離株[(1, 4, 3, 1, 1, 1)]の3型だけであった。今回調べた臨床・環境分離株計65株は34種類に型別された(図1)。

6種のMAbを用いた型別によりSG1の菌は10種類のサブグループに分けられることが知られていた(図2)が、今回調べた65株はそのうちの8種類および新規な型1種類の計9種類に型別された(表2)。環境分離株と臨床分離株でサブグループの頻度に偏りがあった。入浴施設分離株はPhiladelphia、Allentown/France、Knoxville-MAb 8/4-neg.、Oxford Bellinghamの5つのMAb型がみられたが、冷却塔分離株はOLDA、Oxfordの2つの型のみだった。臨床分離株はKnoxville-MAb 8/4-neg.を除き広く分布していた。臨床分離株にみられたBenidorm-MAb 10/6-pos.、Knoxville-MAb 8/4-pos.のMAb型は今回型別した環境分離株にはみられなかった。

病原性に関連すると考えられているMAB 3/1³⁾に着目すると、臨床分離株は74%が陽性であったのに対し、環境分離株の陽性率は22%で、そのうち冷却塔由来株における陽性株は皆無であった(図3)。

2つの型別法を組み合わせると環境分離株(3株の集団感染事例起因菌を含む)は14種類に、臨床分離株は29種類に型別された。重複を除くと、調べた65株は41種類に型別された(表3)。環境分離株と臨床分離株で共通な型は5種類であった(表3で便宜的につけた型番号の1、2、8、10、26)。

D. 考察

今回調べた入浴施設分離株は1株を除いて温泉由来であり、その環境が様々であるため、遺伝的多様性が見られたのであろう。特に、泉質とそこに生息する本菌の遺伝子型との間に相関があるか、調査株数を増やして明らかにする必要がある。また、冷却塔の環境は日本国内で比較的似通っており、その環境に適応的である遺伝子型のものが広く分布していると考えられた。臨床分離

株のうち6株(16%)のみが冷却塔分離株と同じ遺伝子・MAb型であったということはわが国のレジオネラ症の感染源の多くが入浴施設であると考えられていることとも矛盾しない。

遺伝子型、MAb型ともに、環境分離株と臨床分離株との間で、その分布や頻度に乖離が見られた。臨床分離株も本来環境に生息していたはずであることを考えると、環境に生息している*L. pneumophila* SG1の特定の株がレジオネラ症の発生に関与している可能性がある。入浴施設から分離された菌株を型別することで、より具体的なリスクアセスメントを行うことができるようになるかもしれない。

E. 結論

わが国のレジオネラ症の主要な感染源とされる温泉から分離された*L. pneumophila* SG1をSBT法およびMAb型別法を用いて型別したところ、その疫学的有用性が確認できた。

さらに、SBT法による遺伝子型およびMAb型ともに、環境分離株と臨床分離株との間で、その分布や頻度が異なっていた。

F. 参考文献

- 1) Gaia, V, Fry, NK, Afshar, B, Lück, PC, Meugnier, H, Etienne, J, Peduzzi, R, and Harrison, TG. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 43:2047-52.
- 2) Helbig JH, Luck PC, Knirel YA, Witzleb W, Zahringer U. 1995. Molecular characterization of a virulence-associated epitope on the lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1. Epidemiol Infect. 115:71-8.
- 3) Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, Lindsay D, Luck PC, Marques T, Mentula S, Peeters MF, Pelaz C, Struelens M, Uldum SA, Wewalka G, Harrison TG. 2002. Related Articles, Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella*

pneumophila serogroups and monoclonal subgroups. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 21:710-6.

G. 研究発表

1. 刊行物

Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Bin Chang, and Haruo Watanabe: Pulsed-field gel electrophoresis analysis and sequence-based Typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from Japan. pp159-162. In *Legionella*; state of the art 30 years after its recognition

(Edited by Nicholas P. Cianciotto *et al.*)
ASM Press, Washington, D. C., 2006.

2. 学会発表

前川純子、倉 文明、常 彬、渡辺治雄：
Legionella pneumophila のモノクローナル抗体を用いたドレスデンパネルによる分類。第 80 回日本細菌学会総会。2007 年 3 月，大阪。

H. 知的所有権の取得状況

なし。

表1 環境分離株のSBTによる型別

株 no.	由来	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	泉質
65	冷却塔	1	4	3	1	1	1	
121	冷却塔	1	4	3	1	1	1	
122	冷却塔	1	4	3	1	1	1	
124	冷却塔	1	4	3	1	1	1	
182	冷却塔	1	4	3	1	1	1	
217	冷却塔	1	4	3	1	1	1	
223	冷却塔	1	4	3	1	1	1	
224	冷却塔	1	4	3	1	1	1	
225	冷却塔	1	4	3	1	1	1	
226	冷却塔	1	4	3	1	1	1	
228	冷却塔	1	4	3	1	1	1	
237	冷却塔	1	4	3	1	1	1	
239	冷却塔	1	4	3	1	1	1	
418	冷却塔	1	4	3	1	1	1	
292	浴槽	2	3	9	10	2	1	水道水
374	浴槽	2	3	9	10	2	1	単純温泉
370	浴槽	2	12	3	6	<u>8</u>	14	塩化物泉
158	浴槽	3	13	1	10	14	9	ナトリウム塩化物泉
160	浴槽	6	6	15	28	<u>4</u>	14	硫酸塩泉
231	浴槽	6	6	15	28	<u>4</u>	14	アルカリ性単純温泉
128	浴槽	6	10	15	28	<u>4</u>	4	放射能泉
229	浴槽	6	10	17	6	9	4	塩化物泉
295	浴槽	6	10	17	6	9	4	アルカリ性単純温泉
301	浴槽	6	10	19	3	19	4	弱アルカリ性単純温泉
230	浴槽	6	10	21	6	9	4	塩化物泉
126	浴槽	6	<u>16</u>	14	3	21	14	弱アルカリ性単純温泉
159	浴槽	7	6	17	3	14	11	炭酸水素塩泉

下線数字は今までに報告のなかった型

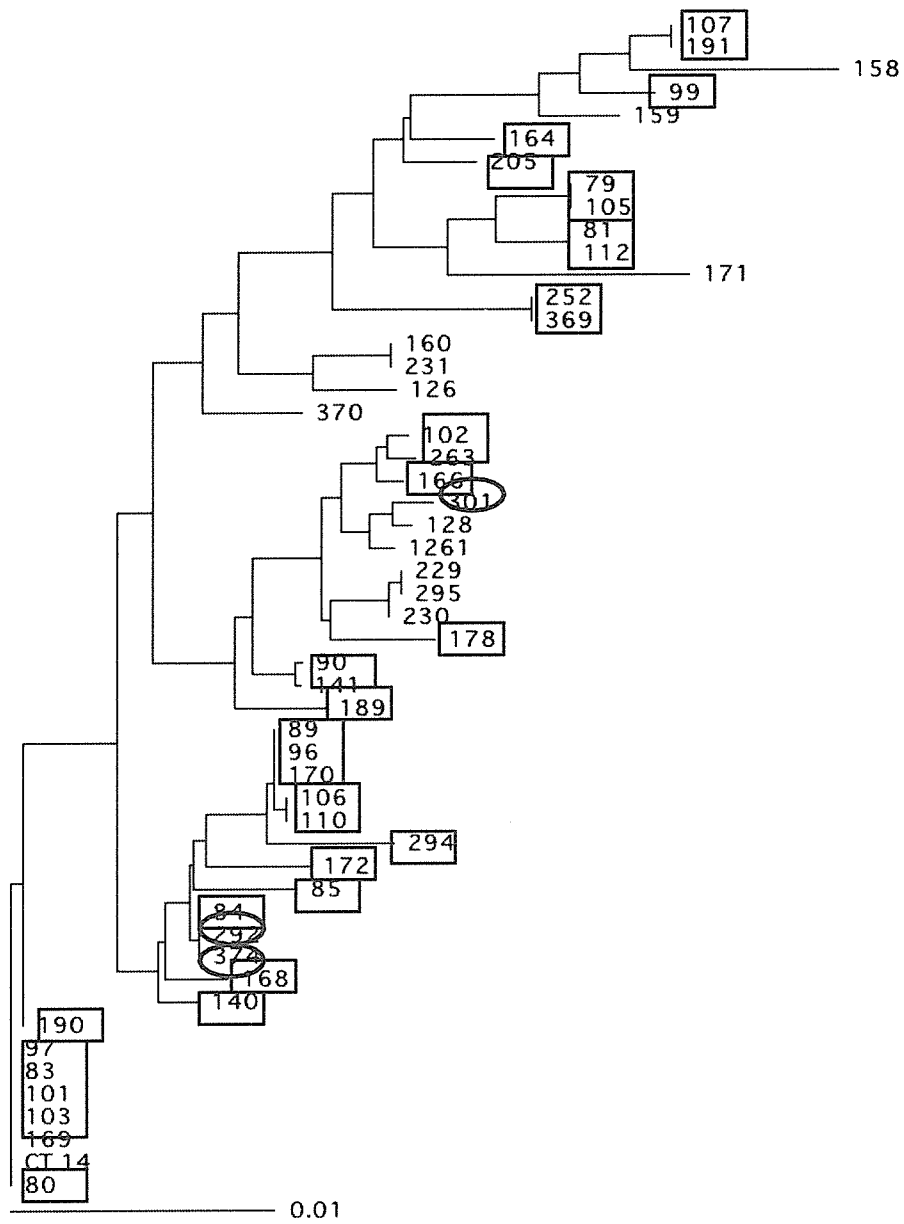


図1 日本各地から分離された臨床および環境分離株 65 株の SBT 型別による系統樹。
 6 つの遺伝子座の塩基配列をつなげて、1 つの配列として、CLUSTALW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)を用いて、系統樹を作成した (NJ 法による)。数字は株名を示している。臨床分離株は株名を四角で囲んだ。冷却塔水分離株はすべて同一の型を示したので、まとめて CT14 と示した。

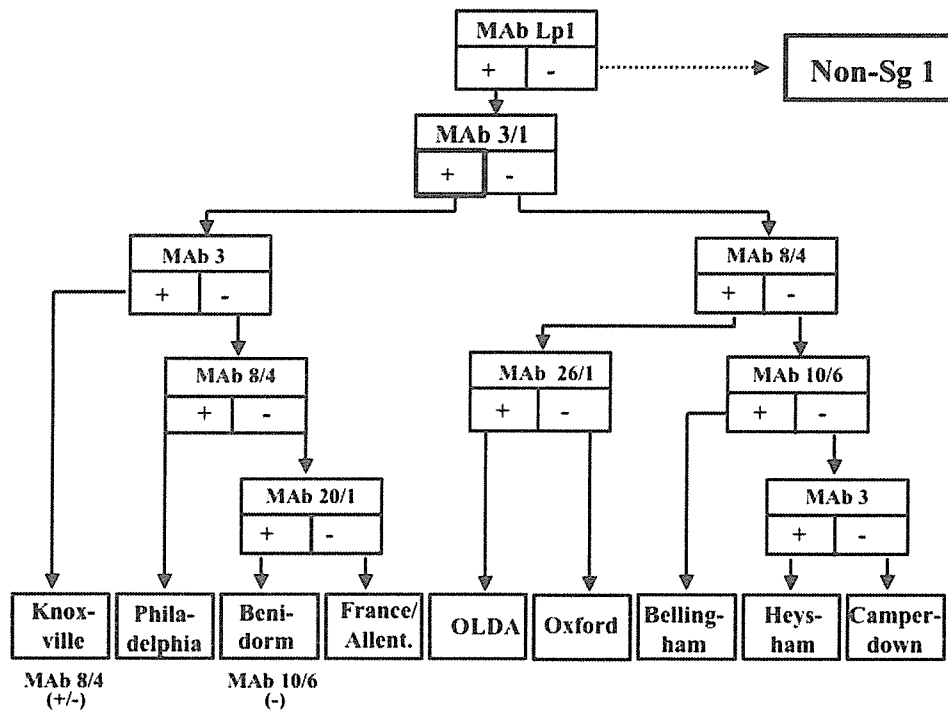


図2 6種のモノクローナル抗体を用いた *L. pneumophila* 血清群1の型別のチャート図(文献3)の図を改変)。KnoxvilleはMAb 8/4により2つのサブタイプに分けられ、これまでに計10種類の型が見いだされている。

表2 モノクローナル抗体による *Legionella pneumophila* 血清群1の型別

サブグループ名	MAb 3/1	臨床分離株数	入浴施設分離株数	冷却塔分離株数
Benidorm - MAb 10/6-neg.	pos.	10 b)	0	0
Benidorm - MAb 10/6-pos. a)	pos.	4	0	0
Philadelphia	pos.	6	4 d)	0
Allentown/France	pos.	5 c)	1 d)	0
Knoxville - MAb 8/4-neg.	pos.	0	1 d)	0
Knoxville - MAb 8/4-pos.	pos.	3	0	0
OLDA	neg.	6 e)	0	8
Oxford	neg.	3 f)	2	6
Bellingham	neg.	1	5	0
計		38	13	14

a) 欧州では未報告の型

b) 入浴施設疑い1例含む

c) 入浴施設疑い3例含む

d) 集団感染起因株(各1)を含む

e) 院内感染疑い1例含む

f) 新生児感染1例含む

Distribution of *L. pneumophila* (SG1) MAb 3/1-positive strains

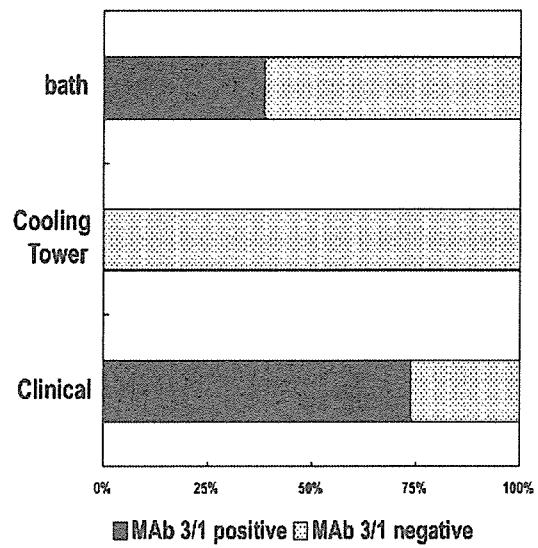


図3 *L. pneumophila* 血清群1の臨床分離株、環境分離株におけるMAb 3/1陽性率

表3 日本各地から分離された *Legionella pneumophila* 血清群1の SBT および MAb 型

型	NIIB No.	Origin	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	Dresden Lp1 Panel	Special serotypes	MAb 3/1
1	65	cooling Tower	1	4	3	1	1	1	Oxford		neg.
	182	cooling Tower	1	4	3	1	1	1	Oxford		neg.
	224	cooling Tower	1	4	3	1	1	1	Oxford		neg.
	237	cooling Tower	1	4	3	1	1	1	Oxford		neg.
	239	cooling Tower	1	4	3	1	1	1	Oxford		neg.
	418	cooling Tower	1	4	3	1	1	1	Oxford		neg.
	103	clinical	1	4	3	1	1	1	Oxford		neg.
2	121	cooling Tower	1	4	3	1	1	1	OLDA		neg.
	122	cooling Tower	1	4	3	1	1	1	OLDA		neg.
	124	cooling Tower	1	4	3	1	1	1	OLDA		neg.
	217	cooling Tower	1	4	3	1	1	1	OLDA		neg.
	223	cooling Tower	1	4	3	1	1	1	OLDA		neg.
	225	cooling Tower	1	4	3	1	1	1	OLDA		neg.
	226	cooling Tower	1	4	3	1	1	1	OLDA		neg.
	228	cooling Tower	1	4	3	1	1	1	OLDA		neg.
	80	clinical	1	4	3	1	1	1	OLDA		neg.
	83	clinical	1	4	3	1	1	1	OLDA		neg.
	97	clinical	1	4	3	1	1	1	OLDA		neg.
	101	clinical	1	4	3	1	1	1	OLDA		neg.
	169	clinical	1	4	3	1	1	1	OLDA		neg.
3	190	clinical	1	4	3	10	1	1	Bellingham		neg.
4	168	clinical	2	1	6	15	2	1	Philadelphia		pos.
5	294	clinical	2	3	18	11	2	10	Allentown/ France		pos.
6	172	clinical	2	3	18	5	5	1	Knoxville	MAb 8/4 pos.	pos.
7	110	clinical	2	3	10	11	2	1	Benidorm	MAb 10/6 pos. * 2	pos.
	106	clinical	2	3	10	11	2	1	Benidorm	MAb 10/6 pos. * 2	pos.
8	374	hot spring * 1	2	3	9	10	2	1	Philadelphia		pos.
9	84	clinical	2	3	9	10	2	1	Oxford		neg.
10	292	hot spring * 1	2	3	9	10	2	1	Allentown/ France		pos.
11	89	clinical	2	3	5	11	2	1	Benidorm	MAb 10/6 pos. * 2	pos.
	96	clinical	2	3	5	11	2	1	Benidorm	MAb 10/6 pos. * 2	pos.
12	170	clinical	2	3	5	11	2	1	Benidorm	MAb 10/6 neg.	pos.
13	141	clinical	2	10	3	13	9	4	Allentown/ France		pos.
14	90	clinical	2	10	3	10	9	4	Knoxville	MAb 8/4 pos.	pos.
15	370	hot spring	2	12	3	6	8	14	Philadelphia		pos.
16	107	clinical	3	4	1	1	14	9	Philadelphia		pos.
	191	clinical	3	4	1	1	14	9	Philadelphia		pos.
17	99	clinical	3	6	1	6	14	11	Benidorm	MAb 10/6 neg.	pos.

18	164	clinical	3	6	1	3	5	11	Benidorm	MAb 10/6 neg.	pos.
19	158	hot spring	3	13	1	10	14	9	Bellingham		neg.
20	81	clinical	4	7	11	3	11	12	Benidorm	MAb 10/6 neg.	pos.
	112	clinical	4	7	11	3	11	12	Benidorm	MAb 10/6 neg.	pos.
21	171	clinical	4	17	11	23	5	12	OLDA		neg.
22	231	hot spring	6	6	15	28	4	14	Bellingham		neg.
22	160	hot spring	6	6	15	28	4	14	Bellingham		neg.
23	166	clinical	6	10	21	13	17	14	Allentown/ France		pos.
24	230	hot spring	6	10	21	6	9	4	Philadelphia		pos.
25	1261	clinical	6	10	19	15	4	4	Knoxville	MAb 8/4 pos.	pos.
26	301	hot spring * 1	6	10	19	3	19	4	Knoxville	MAb 8/4 neg.	pos.
27	229	hot spring	6	10	17	6	9	4	Philadelphia		pos.
28	295	hot spring	6	10	17	6	9	4	Oxford		neg.
29	128	hot spring	6	10	15	28	4	4	Bellingham		neg.
30	263	clinical	6	10	15	13	4	14	Allentown/ France		pos.
31	102	clinical	6	10	15	13	17	14	Benidorm	MAb 10/6 neg.	pos.
32	178	clinical	6	10	15	6	30	14	Benidorm	MAb 10/6 neg.	pos.
33	126	hot spring	6	16	14	3	21	14	Oxford		neg.
34	205	clinical	7	6	17	21	8	11	Benidorm	MAb 10/6 neg.	pos.
35	159	hot spring	7	6	17	3	14	11	Bellingham		neg.
36	140	clinical	8	3	3	15	2	1	Philadelphia		pos.
37	189	clinical	8	10	3	15	8	1	Benidorm	MAb 10/6 neg.	pos.
38	369	clinical	10	12	7	3	16	18	Benidorm	MAb 10/6 neg.	pos.
39	252	clinical	10	12	7	3	16	18	Allentown/ France		pos.
40	79	clinical	12	8	11	20	5	12	Philadelphia		pos.
	105	clinical	12	8	11	20	5	12	Philadelphia		pos.
41	85	clinical	15	19	5	12	18	5	Oxford		neg.

* 1: outbreak case

* 2: new type

厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）

温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究

浴槽水と冷却塔水に棲息する *Legionella pneumophila* の鞭毛遺伝子型に見られる違いについて

主任研究者	倉 文明	国立感染症研究所	細菌第一部
分担研究者	前川純子	国立感染症研究所	細菌第一部
分担研究者	遠藤卓郎	国立感染症研究所	寄生動物部
研究協力者	常 彬	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	鈴木敦子	東京都予防医学協会	
研究協力者	市瀬正之	東京都予防医学協会	

研究要旨： 日本各地の浴槽水および冷却塔水から分離された *Legionella pneumophila* 295 株（浴槽水分離株 166 株、冷却塔水分離株 129 株）について鞭毛をコードしている *flaA* 遺伝子の塩基配列の差異に基づく型別を行った。調べた環境分離株は *flaA* の塩基配列の違いにより 14 種類に分けられた。冷却塔水分離株は 10 種類、浴槽水分離株は 9 種類に分けられ、遺伝子型の分布に違いが見られた。冷却塔水由来分離株は特定の 2 種類の遺伝子型のものが、88%を占めたのに対し、浴槽水分離株はそれとは異なる 5 種類の遺伝子型のものについて合わせると 92%となり、両者で明白な違いが認められた。このことを利用すれば、散発感染事例で臨床分離株から感染源を推測できることが示唆された。

A. 研究目的

レジオネラ症の主要な起因菌である *L. pneumophila* 分離株について、遺伝子型別およびモノクローナル抗体 (MAb) 型別が疫学的に有用であることを分担研究報告「*Legionella pneumophila* 血清群 1 の遺伝子型およびモノクローナル抗体型の解析」において記述したが、遺伝子型およびモノクローナル抗体型をすべて調べるのは労力的にも費用的にも大変である。また、冷却塔分離株 14 株はすべて 1 種類の遺伝子型だった。そこで遺伝子型検査に用いられる遺伝子の 1 つである鞭毛をコードしている *flaA* 遺伝子の塩基配列を多数の浴槽水、および冷却塔水分離株について調べ、分離株の由来により遺伝子の傾向に違いがあるか調べた。また、血清群 1 群以外の *L. pneumophila* についても *flaA* 遺伝子型を調べ、同様の傾向があるか明らかにした。

B. 研究方法

日本各地の浴槽水および冷却塔水から分離された由来の異なる *L. pneumophila* 295 株（浴槽水分離株 166 株、冷却塔水分離株 129

株）を EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections) の方法 (<http://www.ewgli.org/>) に従って、*flaA*、遺伝子の一部領域の塩基配列を決定し、型別を行った。また、デンカ生研のレジオネラ免疫血清 (1-15) により血清群を決定した。血清群が決まらないものについては *L. pneumophila* 特異的な *mip* プライマーによる PCR (国立感染症研究所、地方衛生研究所全国協議会編、病原体検出マニュアル、レジオネラ症 平成 15 年 8 月 29 日改訂版) を行って *L. pneumophila* であることを確認した。今回分離され、調査に用いられた株の血清群は図 1 の通りである。

C. 研究結果

今回調べた浴槽水分離株 166 株、冷却塔水分離株 129 株は *flaA* の塩基配列の違いにより 14 種類に分けられた。冷却塔水分離株は 10 種類、浴槽水分離株は 9 種類に分けられ、遺伝子型の分布に違いが見られた (表 1)。実際の塩基配列は図 2 に示した。

flaA 遺伝子型の割合を見ると、冷却塔水分離株は *flaA1* と *flaA11* が 88%を占め、浴槽

水分離株は *flaA2*, *flaA3*, *flaA6*, *flaA7*, *flaA10* の 5 種類の遺伝子型を合わせると 92% となった (図 3)。

なお、図 1 に示したように、血清群の分布も、浴槽水分離株と冷却塔水分離株とで異なっており、冷却塔水分離株では、血清群 1 がいちばん多く、次いで血清群 7 で、それぞれ 67%、22% を占めるのに対し、浴槽水分離株においては血清群 1 がやはり最も多いもののその比率は 31% で、次いで型別不能 (UT) 株が 20%、さらに血清群 6、5 がそれぞれ 18%、16% と続いた。

D. 考察

EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections) は遺伝子型別の際に、6 つすべての遺伝子型別ができない場合には、*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* の順に遺伝子型別を行うことを推奨している。そこで、多数の分離株の遺伝子型別を行うために、*flaA* 遺伝子のみ型別を行ったが、浴槽水分離株と冷却塔水分離株でその遺伝子型の分布が異なっていることが明らかとなった。今回型別できた 14 種類の *flaA* 型について、それぞれを浴槽水型と冷却塔水型に分けることができる (表 2)。由来が不明の分離株について、その生息域が浴槽水と冷却塔水に限定されると仮定した場合、分離株の *fla* 型が 1, 5, 8, 11, 16, 18 の場合、冷却塔水由来株である確率は 96.7% となり、2, 3, 4, 6, 7, 10, 12, 17 の場合浴槽水由来株である確率 94.2% となり、その由来を推測することができる。このことは患者分離株についてその由来を推定するうえで、有力な手がかりが得られることになる。ただし、感染症発生動向調査によると“推定されるレジオネラ感染源”について記載があるうち、8 割以上がその推定感染源を温泉などの入浴施設としている。空調、冷却塔を感

染源と推定している事例は数%以下と低く、その他多様な感染源が推定されている (表 3)。現状ではレジオネラ属菌の汚染調査は浴槽水と冷却塔水に片寄っていることを考えると、その他のさまざまな感染源となりうる環境についても広く検査を行い、遺伝子型別まで含んだ調査を行う必要がある。

E. 結論

日本各地の浴槽水および冷却塔水から分離された *Legionella pneumophila flaA* 遺伝子による型別を行ったところ分離株は 14 種類に分けられた。冷却塔水分離株は 10 巢類、浴槽水分離株は 9 種類に分けられ、遺伝子型の分布に違いが見られ、患者由来株の遺伝子型別を行うことにより、その感染源が推定できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Bin Chang, Atsuko Suzuki-Hashimoto, Masayuki Ichinose, and Haruo Watanabe: Typing of *Legionella pneumophila* Isolates in Japan by *flaA* Gene 21st EWGLI Meeting, Lisbon, Portugal, May, 2006.

Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Bin Chang, and Haruo Watanabe: Pulsed-field gel electrophoresis analysis and sequence-based Typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from Japan. pp159-162. In *Legionella*; state of the art 30 years after its recognition (Edited by Nicholas P. Cianciotto *et al.*) ASM Press, Washington, D. C., 2006.

G. 知的所有権の取得状況

なし。