

厚生労働科学研究費補助金
地域健康危機管理研究事業

迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る
公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 倉 文 明

平成20（2008）年3月

目 次

I. 総括研究報告

迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究--1

倉 文明

II. 分担研究報告

1. 遺伝子検査法を用いたレジオネラの定量方法-----23
遠藤卓郎、前川純子、荒井桂子、緒方喜久代、杉山寛治、田栗利明、中嶋 洋
2. レジオネラ属菌迅速測定法の有用性および残留塩素濃度との関連-----37
荒井桂子
3. 浴槽水を用いた核酸検出法と培養法の比較検討、および循環式モデル浴槽による迅速検査の有用性の確認-----57
杉山寛治
4. 浴槽水からのレジオネラ属菌の分離培養と DNA の検出および反応阻害の改善-----67
田栗利紹
5. 浴槽水を用いた核酸検出法と培養法の比較検討および衛生管理事例-----77
緒方喜久代、中嶋 洋、佐々木美江、磯部順子、山口誠一、泉山信司、遠藤卓郎
倉 文明
6. Ethidium monoazide(EMA)と PCR のコンビネーションによるレジオネラの生菌と死菌の区別に関する研究-----107
常 彬、前川純子、倉 文明
7. *Legionella pneumophila* 臨床分離株の遺伝子型の解析-----111
前川純子
8. 土壌および給湯水から分離された *Legioella pneumophila* の鞭毛遺伝子型別について
-浴槽水、冷却塔水および臨床分離株との比較-----117
前川純子、遠藤卓郎、常 彬、倉 文明
9. 検査法の検討 1 効率の良いコロニー観察法と生培地の比較検討-----123
森本 洋
10. 標準試料を使用した外部精度管理の試行-----139
渡辺祐子、倉 文明
11. DNA-DNA ハイブリダイゼーション法によるレジオネラ属菌種の同定法の確立-----151
山崎利雄、前川純子

12. アメーバ等によるレジオネラ属菌の病原性評価-----	155
八木田健司	
13. ATP 測定による入浴施設の汚染度のモニタリングに関する研究-----	167
黒木俊郎	
14. 酸性泉由来レジオネラ株に対する温泉水の作用-----	175
藤田雅弘, 倉 文明	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	183

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）
総括研究報告書
迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の
衛生管理手法に関する研究

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	遠藤 卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部
	前川 純子	国立感染症研究所細菌第一部
	八木田 健司	国立感染症研究所 寄生動物部
	山崎 利雄	国立感染症研究所 バイオセーフティー管理室
	荒井 桂子	横浜市衛生研究所
	緒方 喜久代	大分県衛生環境研究センター
	黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所
	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所
	田栗 利紹	長崎県環境保健研究センター
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	森本 洋	北海道立衛生研究所

研究要旨： わが国におけるレジオネラ症の集団発生は入浴施設を介して起きており、浴槽水中でのレジオネラ増殖が大きな問題となっている。現行では浴槽水中のレジオネラ属菌検査は培養を基本としており、結果判定までに 1 週間程度を要している。このため、関係者からは迅速な汚染度評価方法に関する要望が強い。そこで、1) 浴槽水中（736 試料、少数の他の環境水を含む）のレジオネラを DNA 迅速検査により定量し、培養法と比較し、2) 生菌を検出する迅速検査を開発し、3) 迅速検査の対照となる培養法を改良し、精度管理を行い、4) 生息環境を反映する菌の遺伝子型を検索し、5) 現場で ATP を測定して迅速に衛生管理する方法を検討した。

1. 遺伝子検査法を用いたレジオネラの定量方法

検討した市販レジオネラ遺伝子検査キット（CycleavePCR Legionella Detection Kit および姉妹品（CycleavePCR Legionella (5S rRNA) Detection Kit）、および LAMP 法を用いたレジオネラ検出試薬キット E）は、臨床分離株やわが国の環境分離株をほとんど洩れなく検出した。なお、*L. londiniensis* はいずれの検査キットでも検出できなかった。本菌種は培養によって環境中からしばしば分離されることから、遺伝子検査法を選択する場合にはこの点に留意する必要がある。

CycleavePCR Legionella Detection Kit とその姉妹品は、基準菌株として暫定採用した *L. pneumophila* 長崎 80-045 株（30℃、4 日間培養）を用いた検討において定量 PCR としての利用が可能であった。また、プラスミド DNA との対比によると、上記の培養条件で得られた菌 1 cfu 当りのゲノムはおよそプラスミド DNA の 16 コピーに相当していた。ゲノムあたりの 5S rDNA は 3 コピーとされていることから、培養 4 日目の菌体内には 5~6 倍のコピー数の 5S rDNA が含まれていると計算された。また、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E は迅速定性試験用に開発されたものであるが、条件設定を厳密に行えば定量試験法としての

利用も可能と考えられた。いずれの試験方法においても、定量試験を開始する前に正確な検量線を作成することが基本である。

温泉水等の地下水にはしばしばフミン質が含まれており、PCR 反応等の遺伝子増幅反応に阻害的に作用することが指摘されている。酵素溶解法はアルカリ抽出法より鋳型 DNA 回収率が良い傾向がみられ、温泉試料水からの DNA 回収にも優れていた。そこで、浴槽水を [フィルターろ過 → 中性域で酵素処理による溶菌 → シリカカラムによる DNA 回収 → 溶出] の順で処理することとした。

2. 迅速検査と残留塩素濃度との関連

浴槽水 366 試料（培養法で検出した菌数は 10~25,000 cfu/100mL）からのレジオネラ属菌検出率は培養法で 15.8%、LAMP 法で 41.3%、定量リアルタイム PCR (qPCR と略す) 法で 44.0%となり、培養法に比較して高い陽性率を示した。LAMP 法より qPCR の陽性率がやや高かったのは、感度の違いによるものと思われた。qPCR 法の検出菌数は、培養法に比較して 0.02~2200 倍の値をとり、散布図の R は 0.21377 で相関は認められなかった。これは、培養法ではレジオネラ属菌不検出 (10cfu/100mL 未満) であったが、定量リアルタイム PCR 法では検出されたのが 103 試料あったためである。一方、遊離残留塩素が 0.4mg/L 以下の試料中のレジオネラ属菌数分布に制限すると、培養法と qPCR 法の菌数の差は $10^0 \sim 10^1$ 倍と少なく、 R^2 は 0.9922 でよく相関していた。qPCR 法は遊離残留塩素の濃度に関わらず、レジオネラ属菌の遺伝子量を定量することが可能で、日常の管理状態を把握するのに優れた手法と判断された。

3. 浴槽水を用いた核酸検出法と培養法の比較検討および循環式モデル浴槽による迅速検査の有用性の確認

入浴施設の浴槽水の濃縮試料からレジオネラ属菌 DNA を抽出し、その核酸を qPCR 法と LAMP 法の 2 方法で、1 時間程度の反応時間で定量検出を可能にした。特に、レジオネラ属菌数が $10^2 \sim 10^3$ CFU/100mL 以上の浴槽水においては、核酸検出法と培養法の菌数に相関がみとめられた。qPCR 法と LAMP 法の菌数の比較ではさらにより相関が得られたが、qPCR 法の検量線は直線性が高いのに比べ、LAMP 法では検量線の作成が困難で、検出感度に影響を与えていた。温泉水の検体でも qPCR 法で増幅阻害は認められず、今回用いた DNA の抽出・精製法は温泉成分に係らず採用できることがわかった。さらに、循環式モデル浴槽の実験から、qPCR 法を用いて、適切な塩素管理がされ菌検出がない期間と、無殺菌循環で菌数の増加した期間の菌数の変化を正確につかむことができた。qPCR 法は現場の浴槽水のレジオネラ属菌検査に充分応用できることが示された。

4. 浴槽水からのレジオネラ属菌の分離培養と DNA の検出および反応阻害の改善

酵素溶菌法により得られた DNA 抽出液を用いて 16 回繰り返し作製した検量線成績のほとんどにおいて、1.45CFU は定量できたが 0.145CFU は定量できなかった。同じ DNA 抽出液を用いた凍結融解回数による繰り返し再現性を検討したところ、9 回までは安定していた。異なる初期調整菌量を用いて、酵素溶菌法およびフィルター-Dexpat 法で処理して得られた精製 DNA 希釈列による検量線は、重なった直線を描きほとんど違いを認めなかった。酵素溶菌法は、高アンモニアの影響を受けず十分な回収率を維持できたが、遠心上清の色素成分や多量の沈さを含む試料では阻害が認められた。しかしながら、タンパク質消化時間の延長や希釈（或いは洗浄）といった処理の追加により回収率が劇的に改善された。

5. Ethidium monoazide (EMA) と PCR のコンビネーションによるレジオネラの生菌と死菌の区別

EMA はレジオネラの生菌の細胞膜を透過できないが死菌の細胞膜を透過し、染色体 DNA を切断することができた。この切断によって、PCR で死菌は検出されなくなり、生菌のみ検出できた。臨床検体や環境からレジオネラを分離するには 4-7 日間が必要であり時間がかかる。この方法で培養法で得られるものと同様の結果を迅速に入手可能となった。

6. *Legionella pneumophila* 臨床分離株の遺伝子型の解析

61 株のわが国の臨床分離株について遺伝子型別 (SBT) を行い、EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections) のデータベースに登録した。61 株は 39 種類に型別され、多様性に富み、SBT による型別の分子疫学的有用性が確認された。また、61 株の臨床分離株について、鞭毛遺伝子 *flaA* 型を見ると 50 株 (82%) が浴槽水分離株型であった。

7. 土壌および給湯水から分離された *Legionella pneumophila* の *flaA* 型別について

日本各地の土壌から分離された *Legionella pneumophila* 33 株と都内の給湯水分離株 12 株について *flaA* 遺伝子の塩基配列の差異に基づく型別を行った。給湯水由来株は、*flaA2*、*flaA3*、*flaA6*、*flaA7* の 4 つの遺伝子型で 83% となり、以前調べた浴槽水由来株とよく似た傾向を示した。土壌由来株の *flaA* 遺伝子型は、一部浴槽水由来のものと同重なっていたが、頻度が大きく異なり (*flaA2* と *flaA6* で 57%)、また浴槽水由来株では見られない遺伝子型 (*flaA5*、36%) も存在した。

8. 効率のよいコロニー観察法と生培地の比較検討

出現集落に斜光をあて、実態顕微鏡で観察すると、レジオネラ属菌は特徴的なカットグラス様の形態(外観構造)を示す。これにより他の細菌との見極めが簡易になり、9620 集落を対象に培地上の正確なレジオネラ集落のカウントし、複数種類のレジオネラの釣菌を効率的に行えた。また、選択分離培地、WYO α (1 社)、MWY (1 社)、GVPC (5 社) 寒天生培地を使用して、実際の温泉水を検査したところ、培地の種類により検出数、検出種類、集落形態・大きさ、出現時期等に違いが認められた。また同じ GVPC 寒天生培地でも各社で違いが認められた。これらのことが、検査結果に影響を与えている可能性が示唆された。

9. 標準試料を使用した外部精度管理の試行

レジオネラ属菌の培養検査結果は、外部精度管理が求められている。そこで、1 枚のディスクに含まれる菌数が *L.pneumophila* 1 群が 10³CFU のもの (試料 1) と、*L.pneumophila* 5 群が 10⁵CFU (試料 2) のディスクを作製した。このディスクを郵送で配布したところ、試料 1 では、各機関で行っているレジオネラ属菌検査法ではほとんど検出することができなかった。試料 2 でも、各機関の回収率は、6.4~21.8% と少なかったが、各機関の 5 回の結果の CV% では著しく高値ではなかった。精度管理用 LENTICULE ディスクの作製方法が報告されていることから、この方法についても検討が必要であると考えられた。

10. DNA-DNA ハイブリダイゼーション法によるレジオネラ属菌種の同定法

浴槽水から分離される *L.londiniensis* のように、市販 DDH キットで同定できないレジオネラ属菌種を、DDH 法により同定可能にすることを最終目標にしている。今年度は、複数の基準株より抽出した DNA のマイクロプレートへの固定の方法を検討し、代表的なレジオネラ属菌を DDH 法により同定できることを確認した。

11. アメーバ等によるレジオネラ属菌の病原性評価

これまで開発した ID50 (50%infectious dose、50%感染濃度) による解析法を用いて、*L. pneumophila*、*L. dumoffii*、*L. longbeachae*、*L. bozemanii* ならびに *L. londinienis* の菌株の病原性を調べた。菌種では *L. pneumophila* が最も病原性が高い傾向にあることが示された (ID50: 1.1~4.4 cfu/0.1ml)。2002 年の宮崎県集団感染事例において、浴槽に多数検出されたにも関わらず抗体価上昇の認められなかった *L. londinienis* は宿主アメーバへの感染が認められず、病原性は著しく低い (ID50: $>1.2 \times 10^4$ cfu/0.1ml) と考えられた。

12. ATP 測定による入浴施設の汚染度のモニタリング

温泉施設の浴槽水を対象にして、従属栄養細菌数、一般細菌数、レジオネラ属菌数および ATP 量を測定した。ATP 量は従属栄養細菌数および一般細菌数にほぼ並行していた。浴槽水の菌濃度あるいは汚れの度合いの指標として ATP 量を利用することの可能性が示唆された。

13. 酸性泉由来レジオネラ株に対する温泉水の作用

pH6 未満の酸性泉及び泉温 55°C 以上では、ほとんどレジオネラが検出されないが、酸性泉からもレジオネラ属菌が、ごくまれに検出されることがある。今回、酸性泉の温泉水から分離された 3 株の *Legionella saintelensis* (以下、Ls) を用いて、掛け流し式温泉として利用されている代表的な酸性泉の温泉水の Ls に対する作用について調べた。この酸性泉の浴槽水では、Ls に対しても殺菌効果を有することが分かった。さらに、pH2.0 の希硫酸溶液を用いた酸性条件下において、これらの菌株に対するマンガニオン及びヨウ素イオンの影響を検討した。*L. pneumophila* はマンガニオンとヨウ素の両イオン濃度の相互的作用により 60 分間経過後の菌数の減少がみられたが、Ls はマンガニオン濃度の影響を受けにくかった。

A. 研究目的

わが国におけるレジオネラ症の集団発生は入浴施設を介して起きており、浴槽水中でのレジオネラ増殖が大きな問題となっている。現行では浴槽水中のレジオネラ属菌検査は培養を基本としており、結果判定までに 1 週間程度を要している。このため、関係者からは迅速な汚染度評価方法に関する要望が強い。近年、迅速検査法として多方面で遺伝子検査が導入されており、レジオネラ検出用の試薬も市販されている。これまでに、遺伝子検査を用いて定性検査がなされており、迅速性に優れるものの、培養法との検査結果の不一致が指摘されたり (培養法に比べ陽性率が高い)、あるいは温泉水中の増殖阻害物質が問題とされてきた。また、50 種以上存在するレジオネラ属菌に対する反応性については情報が得られていない。そこで、基準となる菌種を選択し、

厳密な培養条件のもとで得られた菌を用いて遺伝子検査と培養法による菌量計算を行い、両者の関係付けを行なった。

また、迅速でかつ現行の培養法の結果とよく対応できるようにするために生菌を検出する PCR 法の開発を検討した。

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が感染源の不明な例も多い。そこで、レジオネラ症の起因菌株について、レジオネラレファレンスセンターにおいて収集を開始し、遺伝子型別 (SBT) を行った。さらに、SBT において生息環境の推定に有用な *flaA* について、土壌や給湯水から分離される *L. pneumophila* について *flaA* の型別をおこない、その特徴付けを行った。

B. 研究方法および材料

1. 遺伝子検査法を用いたレジオネラの定量

方法

Legionella pneumophila の 1~15 血清群参照株 16 株、および untypable の 3 株、7 菌種の 14 biotype を含む、50 菌種、75 株を使用した (表 1)。基本的にレジオネラは BCYE α 培地で 35°C、4~7 日間培養し、菌体より DNA を精製した。一部の菌株は、30°C あるいは 5% 炭酸ガス存在下 (両条件の場合を含む) で培養した。レジオネラ属菌以外との交差反応性を検討するため、R2A 寒天平板培地を用いて 37°C、48 時間の培養で分離された菌 (従属栄養細菌) のコロニー ($10^2 \sim 10^6$ コロニー) をすべて回収して作製した混合菌液より DNA を抽出し、 10^6 cfu/tube 相当の DNA を鋳型とした。

1980 年にレジオネラ肺炎患者より分離され、わが国における *L. pneumophila* serogroup 1 の基準株として広く用いられている長崎 80-045 株 (斉藤ら、1981) を暫定的な基準株とした。この保存株を BCYE α 培地 (DIFCO) に植え、30°C、4 日間培養した。35°C で培養しないのは、細長い形態の菌となるのを防ぎ正しい DNA-cfu 関係を求めるためである。得られた菌を生理食塩水に McFarland No. 2 程度の濃度に懸濁し、数段階の 10 倍希釈系列を作製し、希釈液ごとに DNA 抽出を行い、あわせて培養による菌数測定を行なった。

DNA 抽出はアルカリ抽出法と中性域での酵素溶菌法 (以下、酵素溶菌法) の 2 方法を用いた。酵素溶菌法では、DNA 抽出工程を中性域 (pH 7.6 の TE 緩衝液使用) で行い、リゾチームおよび Proteinase K により溶菌する。この 2 方法で使用する DNA 回収用シリカ・カラムは少量の溶出液 (20 μ L) による回収用としてシリカ量が調整されているものを使用した。

リアルタイム PCR (ここではサイクリ

ングプローブ法) や LAMP 法といった新しい遺伝子増幅法を用いた複数のキットを相互比較して検討した。サイクリングプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組合せにより蛍光を検出し、高感度で非常に配列特異性が高い。LAMP 法は、被検試料を恒温で培養し、濁度測定によってレジオネラを検出する迅速簡便な方法である。これら 2 つの方法は、それぞれ 5S rRNA 遺伝子、16S rRNA 遺伝子という異なる遺伝子を標的にしている。

2. 浴槽水の検査

200mL あるいは 500mL の浴槽水をろ過濃縮 (ミリポア ISOPORE GTTP02500 あるいは HTTP04700、ポリカーボネート 0.2 μ m, 0.4 μ m) した。ろ過のできなかった薬湯の一部は遠心濃縮した。培養法は GVPC 培地で 37°C、5~7 日間培養し、DNA の抽出は酵素溶菌法 (遺伝子検査法を用いたレジオネラの定量方法の項を参照) により行った。同時に遊離残留塩素濃度 (現場測定、DPD 法) を測定した。なお、一部の報告で用いられたキレックス法は濃縮試料 1000 μ L を分取し 12000rpm で 5 分遠心後、上清を除去して沈渣に 5% キレックス溶液 200 μ L を添加、99°C、5 分加熱処理し DNA 抽出を行った。

サイクリングプローブ法、LAMP 法等の感度、特異性を検討し、阻害物質が浴槽水に含まれる場合を含め、浴槽水を濃縮し DNA を抽出する手順を標準化し、この手法に基づいて、浴槽水からのレジオネラの分離培養と DNA の検出を比較した。

3. Ethidium monoazide (EMA) と PCR のコンビネーションによるレジオネラの生菌と死菌の区別

レジオネラ属菌 16 株 (*Legionella*

pneumophila 12 株および *L. pneumophila* 以外のレジオネラ 6 株) を生理食塩水に懸濁させ、約 10^7 CFU/ml の懸濁液を作製した。これらの菌液を 95°C で 2 分間熱処理または 1 ppm 塩素で室温 30 分殺菌により死菌を調製した。生菌また死菌を含む懸濁液に EMA 20 $\mu\text{g/ml}$ を添加し、遮光下 4°C で 10 分間放置した後、可視光を 5 分間照射した。常法により染色体 DNA を精製し、レジオネラの 16S rDNA および *mip* (*L. pneumophila* のみ) 遺伝子をターゲットとする PCR を行った。

4. *Legionella pneumophila* の遺伝子型の解析

今回新たに収集された *L. pneumophila* の臨床分離株 20 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*、*neuA* 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。2007 年 10 月に従来の 6 つの遺伝子に加え、*neuA* 遺伝子が追加され、7 つの遺伝子により SBT を行うことになった。

本研究は、国立感染症研究所の病原体取扱管理規定にしたがい、周辺の環境の汚染を引き起こさず、個人情報保護に十分に配慮して行われた。

C. 研究結果

1. 遺伝子検査法を用いたレジオネラの定量方法

1.1 試料の泉質を考慮した DNA 抽出方法の検討:

温泉水等の地下水にはしばしばフミン質が含まれており、PCR 反応等の遺伝子増幅反応に阻害的に作用することが指摘されている。実際 0.6mg/mL のフミン酸を添加すると、アルカリ抽出法では著しい PCR 反応の阻害が見られ、非添加対

照に対する相対回収率は 7%程度にまで低下した。酵素溶菌法を用いることにより、フミン酸を添加試料から得た鋳型 DNA による反応効率は非添加群と遜色ない程度に向上した。フミン質を含み、PCR の反応阻害が確認されている温泉試料水に既知の菌数 (1.2×10^8 cfu/mL) のレジオネラを添加した菌液を用意し、各条件での相対回収率を比較すると、酵素溶菌法はアルカリ抽出法鋳型 DNA 回収率が良い傾向がみられ、温泉試料水からの DNA 回収にも優れていた (表 2)。そこで、浴槽水を [レジオネラをフィルターろ過 → 中性域で酵素処理による溶菌 → シリカカラムによる DNA 回収 → 溶出] の順で精製することとした。

1.2 特異性

Legionella 属に属する 50 菌種、75 株 (含む、*L. pneumophila* SG 1~15、untypable 3 株、7 菌種の 14biotype) を用いてリアルタイム PCR 試薬キット、および LAMP 試薬キットの検出特性を検討した (表 1)。リアルタイム PCR 法では 10 cfu/tube 相当の DNA 量を用いて 40 サイクル以内の増幅反応が閾値を超えた場合に「検出可能な菌種・菌株」とし+と表示した (*L. geestiana* は 10 cfu/tube 相当の鋳型 DNA では不検出、100 cfu/tube 相当以上で陽性なので (+) と表記した)。また、LAMP 法では、 $60 \sim 10^4$ cfu/tube 相当未満の鋳型 DNA 量を用いて増幅反応が閾値に達した場合を+で表記した。リアルタイム PCR では *L. geestiana* を含めると 39 菌種 62 株の検出が可能であった。LAMP 法では 37 菌種 61 株が検出可能と判断された。この中には LAMP 法で *L. birminghamsis* が不検出となったのを除き、*L. pneumophila* 血清群 1~15、および臨床分離株が含まれていた。*L. birminghamsis* による症例は免疫抑制状

態にあった臓器移植患者の 1 例が知られているが (Wilkinson et al., 1987)、臨床的には必ずしも重要菌種とは考えられない。一方、リアルタイム PCR では 11 菌種 13 株、また、LAMP 法では 13 菌種 14 株が 10^4 cfu/tube 相当以上でも不検出となったが、それらの多くはわが国での分離例がないか、あるいは稀にしか分離されない菌種に限られた。なお、環境からはしばしば *L. londiniensis* が培養分離されているが (岡田ら、2005)、いずれの方法によっても不検出であった。培養と迅速検査の不一致は避けなければならないが、標的遺伝子の配列解析から *L. londiniensis* の遺伝子配列は他の *Legionella* 属菌と相同性が低く (unpublished data)、専用の検出キットの開発等による別途対応が望まれるものとする。一方、非特異反応の検証として、浴槽水試料から分離した従属栄養細菌の DNA を鋳型として両方法により DNA 増幅を試み、いずれの反応においても陽性反応は認められなかった。

1.3 定量 PCR

L. pneumophila SG1 80-045 株の菌の段階希釈液を用意し、それぞれにつき培養法で菌数 (cfu/ml) を求め、酵素溶菌法により鋳型 DNA を調製した。得られた鋳型 DNA を用いて定量 PCR を行い Ct 値を縦軸、培養法によって得られた菌数を横軸として作成した分布図 (図 1) から両者間には $y = -1.42 \ln(x) + 37.1$ 、($r^2=0.9995$) で近似される強い相関関係が確認され、定量性は十分に保証されていた。また、5S rDNA の部分配列 (122bp; 一部の配列を置換) を導入したプラスミド DNA を用い、プラスミドのコピー数と定量 PCR 反応による Ct 値から検量線を作成した。得られた検量線は $y = -1.40 \ln(x) + 41.2$ 、($r^2=0.9964$) で近似された。両検量線 (近似曲線) はほぼ平行関係に

あり、両者において DNA の増幅効率に差がないことが示された。また、菌 1 cfu 相当から得られる 5S DNA 量はプラスミド 16 ($\approx 2^4$) コピーに相当していた (図 1)。ちなみに、レジオネラ属菌においてはゲノムあたりの 5S rDNA のコピー数は 3 個とされている。

また、3 種類の PCR 装置を使用し、 $2 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^7$ cfu の範囲にある既知濃度の菌液の Ct 値を少なくとも 3 回以上測定したところ、3 装置間の測定誤差は僅かであった。これらのデータを 1 つにまとめたものが図 2 で、近似式 $y = -1.32 \ln(x) + 38.7$ 、($r^2=0.9528$) が得られた。1 cfu/tube に相当する鋳型 DNA 量で確実に陽性反応が得られた。

LAMP 法は定性試験として開発されているものであるが、DNA 増幅が始まり、反応液の濁度が基準に到達する時間 (Tt 値) が鋳型 DNA 量に相関し、DNA 量が増すにつれて短くなる。そこで、*L. pneumophila* (SG1 80-045 株、30°C、4 日間培養) の菌数と Tt 値による分布図を作成して、両者の相関性について検討したところ、Tt 値と菌数には相関が認められ、定量試験への適用の可能性が示された (図 3)。

両方法とも、実際的な検出限界は 1 cfu/tube 程度まで下げることが可能であった。

2. 浴槽水の DNA 迅速検査と残留塩素

2.1 培養法と迅速法の定性の結果

培養法及び qPCR 法の検出限界をそれぞれ 10cfu/100mL、5 cfu/100mL としたところ、浴槽水 366 試料のレジオネラ属菌の陽性率は培養 15.8% に比較し、LAMP 法 41.3%、qPCR 法 44.0% と迅速法は高い値を示した (表 3)。LAMP 法では培養法が陰性であった 94 試料が陽性を示し、培養法が陽性であった 1 試料が陰性

を示した。また、qPCR 法では、培養法が陰性であった 103 試料が陽性を示し、培養法が陽性で陰性を示した試料はなかった。培養法陰性で LAMP 法及び qPCR 法が陽性であった試料の残留塩素濃度を調査したところ、残留塩素が検出されたのは 91 試料及び 97 試料であった。なかでも、残留塩素が 1.0mg/L を超過していたのはともに 41 試料あった。迅速法は培養可能な生菌の他、培養不可能菌や死菌等の DNA を増幅している可能性があるため、培養法よりも高い陽性率を示すと考えられた。また、qPCR 法が陽性を示した 161 試料のうち、LAMP 法が陰性を示したのは 10 試料存在した。このうち、9 試料は qPCR 法の定量測定値が 10 cfu/100mL 以下と低い値を示し、qPCR 法と LAMP 法の感度の差が結果に反映したと考えられた。残る 1 試料は、ナトリウム-塩化物・炭酸水素塩の泉質の温泉試料で、非常に濃い黒褐色を呈している（色度約 3,000 度）ことから、多量のフミン質を含むと思われる（培養法 1,200 cfu/100mL、qPCR 法 20 cfu/100mL）。そこで、前処理工程の一部を変更し（核酸をせん断した後の 15,000rpm3 分間遠心分離後上清採取を 2 回行う）たところ、LAMP 法で陽性を示した（qPCR 法の菌数も 62,000cfu/100mL に増加）。

2.2 培養法と qPCR 法の定量

培養法と qPCR 法の定量結果を図 4 に示した。qPCR 法の検出菌数は、培養法に比較して 0.02~2200 倍の値を、 $R = 0.21377$ で相関は認められなかった。これは、培養法ではレジオネラ属菌不検出（10cfu/100mL 未満）であったが、qPCR 法では検出されたのが 103 試料あったことが大きな要因と考えられた。

2.3 レジオネラ属菌定量結果と残留塩素

366 試料のうち、測定不能等であった 6 試料を除く 360 試料中、遊離残留塩素が検出されなかった（0.1mg/L 未満）試料数は 45 であった。一方、残留塩素が 1.0mg/L を超過した試料数は 115、中でも、2.0mg/L を超過した試料数は 38 であった。

遊離残留塩素が 0.4mg/L 以下の試料中のレジオネラ属菌数分布によると、培養法と qPCR 法の菌数の差は $10^0 \sim 10^1$ 倍と少なく、 R^2 は 0.9922 でよく相関していた（図 5）。一方、遊離残留塩素が 1.0mg/L を超過する試料中のレジオネラ属菌数分布によると、培養法でレジオネラ属菌が検出されたのは 3 試料に留まったが、PCR 法では 44 試料から検出された（図 6）（遊離残留塩素値が 2.0mg/L 以上は便宜上 3.0mg/L としてプロットした）。培養法と qPCR 法の菌数の差は、 $10^0 \sim 10^5$ 倍であった。培養法でレジオネラ属菌が検出されなくても、PCR 法で高濃度にレジオネラ属菌が検出された場合、清掃・換水によりレジオネラ属菌の生菌数が減少したのではなく、塩素殺菌により減少したことが推察される。培養法に比較して qPCR 法は、遊離残留塩素に左右されずに浴槽水に残存するレジオネラ属菌の遺伝子を捕獲することができるので、日常の衛生管理状態を把握できると考える。

3. 浴槽水を用いた核酸検出法と培養法の比較検討および循環式モデル浴槽による迅速検査の有用性の確認

3.1 核酸検出法と培養法の相関

74 検体の浴槽水の各検査法での定量値をもとに、qPCR と培養法（図 7）、LAMP と培養法（図 8）、qPCR と LAMP（図 9）の散布図を作成した。核酸検出法と培養法では $10^2 \sim 10^3$ CFU/100mL 以上の菌数であれば相関があることが示唆された。

qPCR 法と LAMP 法の菌数の比較ではさらにより相関が得られたが、qPCR 法で 10^3 CFU/100mL 以下の菌数で検出される検体において、LAMP 法で不検出のものが多くあった。

3.2 モデル浴槽でのレジオネラ属菌の推移を qPCR 法と培養法で比較

モデル浴槽において、塩素管理入浴中、塩素消失後、無殺菌循環後のレジオネラ属菌数の推移を長期間にわたって経日的に測定し、qPCR 法と培養法の両方で比較した (図 10)。残留塩素濃度が 0.4mg/L で塩素管理中の浴槽水は qPCR 法、培養法のいずれでもレジオネラ属菌は検出されなかった。qPCR 法と培養法の菌数はよく一致し、菌数の推移のグラフも類似していた。また、培養法の菌数が 10^5 CFU/100mL 以上では qPCR 法の菌数が 1 オーダー程度低く検出される傾向があった。qPCR 法で、適切な塩素管理がされ菌検出がない期間と、無殺菌循環で菌数の増加した期間の菌数の変化を正確につかむことができたことから、qPCR 法を現場の浴槽水のレジオネラ属菌検査に応用可能と思われた。

無殺菌 9 日目の浴槽水 (培養法で 10^6 CFU/100mL の菌数) の循環浴槽系を過酸化水素水で洗浄した後、2 回換水してから採水した検体からは、培養法で菌検出がなかったが、qPCR 法で 10^4 CFU/100mL の菌数相当の DNA が検出された。このことは一旦レジオネラ属菌数の顕著な増加があったときには、薬剤等で洗浄し、換水しても死菌に由来する DNA が相当な量で検出されることを示唆しており、洗浄前のレジオネラの著しい汚染状況を推定できる可能性を示すものである。

4. 浴槽水からのレジオネラ属菌の分離培養と DNA の検出および反応阻害の改

善

4.1 凍結保存した精製 DNA を用いた検量線

qPCR 法における検量線の再現性は定量性に影響する最も重要な要素のひとつであるが、検査ごとに菌液から DNA を抽出して作成・検証することは現実的でない。そこで希釈系列の菌液から抽出した DNA を一度に抽出・小分けして凍結保存したのから安定した検量線を得ること考えた。また抽出方法の違いによる影響をみるために、同じ菌液をフィルターろ過-Dexpat 法と酵素溶菌法でそれぞれ抽出して得た検量線を比較した。

酵素溶菌法により得られた DNA 抽出液を用いて 16 回繰り返し作製した検量線成績のほとんどにおいて、1.45CFU は定量できたが 0.145CFU は定量できなかった。加えて、1.45CFU 溶液の二倍希釈液 (0.725CFU) は定量できたため、この値を今回の定量下限値とした。同じ DNA 抽出液を用いた凍結融解回数による繰り返し再現性を検討したところ、9 回までは安定していたが、10 回以降は定量下限値が 1 オーダー高くなった。

異なる初期調製菌量を用いて、酵素溶菌法およびフィルター-Dexpat 法で処理して得られた精製 DNA 希釈列による検量線は、重なった直線を描きほとんど違いを認めなかった。

4.2 PCR 反応阻害が見られた場合の改善

酵素溶菌法は、高アンモニアの影響を受けず十分な回収率を維持できたが、遠心上清の色素成分や多量の沈さを含む試料では阻害が認められた。しかしながら、タンパク質消化時間の延長や希釈 (或いは洗浄) といった処理の追加により回収率が劇的に改善された。

5. Ethidium monoazide (EMA) と PCR の

コンビネーションによるレジオネラの生菌と死菌の区別

レジオネラの生菌は 16S rDNA または *mip* 遺伝子をターゲットとする PCR により検出された。また、EMA 処理を行ったすべてのレジオネラ生菌も PCR により検出された。EMA 処理の有無による PCR バンドの濃さの違いは見られなかった。しかし、加熱死菌と塩素処理死菌に EMA 処理を行うと PCR のバンドが見られなかったため、死菌は検出されなかった。この結果から EMA と PCR のコンビネーションはレジオネラの生菌と死菌を区別できることを示唆した。今後、実際の浴槽水で培養法との対応を確認する必要がある。

6. *Legionella pneumophila* 臨床分離株の遺伝子型の解析

レジオネラレファレンスセンターにおいて *Legionella pneumophila* 臨床分離株の収集を開始した。うち 20 株について遺伝子型別 (SBT) を行った。以前に収集、型別した臨床分離株についても、従来の 6 つの遺伝子に *neuA* 遺伝子が追加され、7 つの遺伝子により SBT を行うことになったため、*neuA* 遺伝子の型別を行った。あわせて 61 株のわが国の臨床分離株について型別を行い、EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections) のデータベースに登録した。61 株は 39 種類に型別され、多様性に富み、SBT による型別の分子疫学的有用性が確認された。また、浴槽水分離株と冷却塔水分離株とで *flaA* の遺伝子型に違いがあることを既に明らかにしているが、61 株の臨床分離株について、*flaA* 遺伝子型を見ると 50 株 (82%) が浴槽水分離株型であった。感染源が浴槽と確定している 8 株と推定されている 9 株の計 17 株はすべてその中に含まれていた。

7. 土壌および給湯水から分離された *Legionella pneumophila* の鞭毛遺伝子型別について

日本各地の土壌から分離された *Legionella pneumophila* 33 株と都内の給湯水分離株 12 株について *flaA* 遺伝子の塩基配列の差異に基づく型別を行い、以前調べた浴槽水、冷却塔水および臨床分離株と比較した。冷却塔水由来株は *flaA1* と *flaA11* の 2 つの遺伝子型で 88% を占め、浴槽水分離株は *flaA2*、*flaA3*、*flaA6*、*flaA7* の 4 つで 85% となり、*flaA* 遺伝子型の分布に違いが見られたが、給湯水由来株は、*flaA2*、*flaA3*、*flaA6*、*flaA7* の 4 つの遺伝子型で 83% となり、浴槽水由来株とよく似た傾向を示した (図 11)。土壌由来株の *flaA* 遺伝子型は、一部浴槽水由来のものと同重なっていたが、頻度が大きく異なり (*flaA2* と *flaA6* で 57%)、また浴槽水由来株では見られない遺伝子型 (*flaA5*、36%) も存在した。臨床分離株の *flaA* 遺伝子型から感染源の推測がどの程度可能かを考察した。

8. 効率のよいコロニー観察法と生培地の比較検討

実際の環境試料を用いた結果では、培養 3 日目以降に発育が認められた集落において特に、標準菌株と同様の特徴的な形態を示したものが多数認められた。全 763 試料中 698 試料で特徴的な形態を示した集落が認められた。それら特徴的な形態を示した 9620 集落について釣菌し同定検査を行った結果、9239 集落がレジオネラ属菌と同定された (96%)。なお、一般的にレジオネラ属菌の集落は灰白色湿潤集落と言われていることから、全 763 試料でカットグラス様等の形態的特徴のない灰白色湿潤集落 5347 集落についても確認検査を行った結果、それらはすべて非レジオネラ属菌であった。

9 試料を用いて生培地の比較検討を行ったところ、すべてでレジオネラ属菌は確認されたが、9 試料すべてからレジオネラ属菌を検出できた培地はなかった。今回最もレジオネラ属菌の検出頻度が高かった培地は WYO α (栄研) で9 試料中8 試料、次いで GVPC (Biomerieux、Oxoid) が7 試料、MWY (Oxoid)、GVPC (Merk、日研) が6 試料、GVPC (極東) が4 試料であった。今回の供試試料では、WYO α (栄研) に GVPC (Biomerieux) を組み合わせることにより、全試料からレジオネラ属菌を検出することができた。しかしながら、この組み合わせでも今回確認された全菌種を検出することができなかった。

9. 標準試料を使用した外部精度管理の試行

レジオネラ属菌の培養検査結果は、検査法に多くの方法が認められていること、検査機関により検出される菌数が著しく異なる場合があるなど、外部精度管理が求められている。そこで、菌数1枚のディスクに含まれる菌数が *L. pneumophila* 1群が 10³CFU のもの (試料 1) と、*L. pneumophila* 5群が 10⁵CFU (試料 2) の菌量になるよう、病原体検出マニュアルのゼラチン・ディスク作製法に従い、ディスクを作製した。ディスクの溶解時の温度やディスクの保存温度の影響について調査したところ、ディスクの保存は一日 4℃で保存した場合 60%程度減少していたが、1週間保存ではあまり差がなくなっていた。また、-80℃で保存した場合は、1週間保存でもほとんど変化がなかった。このディスクを郵送で配布したところ、試料 1 では、各機関で行っているレジオネラ属菌検査法ではほとんど検出することができなかった。試料 2 でも、各機関の回収率は、6.4~21.8%と少な

かったが、各機関の5回の結果の CV%では著しく高値ではなかった。今後は、精度管理のための配付試料の作製方法の検討を行うとともに、回収率の低さやバラツキの原因として現在の指針の検査法の行程や選択肢が多いことが考えられたため、現行のレジオネラ属菌検査法の行程や選択肢ごとに回収率の検討を行い、検査法自体の回収率を改善し、統一した検査法として確立していく必要があると考えられた。また、精度管理用 LENTICULE ディスクの作製方法が報告されていることから、この方法についても検討が必要であると考えられた。

10. DNA-DNA ハイブリダイゼーション法によるレジオネラ属菌種の同定法

基準株 DNA のプレートへの固定方法について、固定させる DNA 濃度、固定時間、各ステップでの洗浄の有無等を検討した。その結果、レジオネラ属菌用 DDH 法プレート作製方法は、以下のように決定した。0.1 M MgCl₂ 含有 PBS にて 5 μ g/ml の濃度に調整した基準株 DNA を、100℃で5分間加熱後、急冷して1本鎖にし、100 μ l ずつマイクロプレート (Nunc 468667) に分注し、30℃で1晩放置し、固定する。溶液を破棄後、0.1 M MgCl₂ 含有 PBS にて 50pg/ml の濃度に調整したサケ精子 DNA を、100℃で10分間加熱後、急冷して1本鎖にし、300 μ l ずつマイクロプレートに分注し、37℃2時間プレハイブリダイゼーションを行う。溶液を破棄後、50℃で2時間プレートを乾燥する。*L. pneumophila*、*L. feeleii* の各菌を基準株として、DDH を行った結果、5分後のそれぞれの相対類似度は、20%と4%で判定基準に照らして *L. pneumophila*、*L. feeleii* と同定された。

11. アメーバ等によるレジオネラ属菌の病原性評価

これまで開発した ID50 (50%infectious dose、50%感染濃度) による解析法を用いて、*L. pneumophila*、*L. dumoffii*、*L. longbeachae*、*L. bozemanii* ならびに *L. londinienis* の菌株の病原性を調べた。菌種では *L. pneumophila* が最も病原性が高い傾向にあることが示された (ID50: 1.1~4.4 cfu/0.1ml)。血清群による差は明らかではないが、ヒトからの臨床分離株と同程度の病原性が環境分離株にも認められた。2002 年の宮崎県集団感染事例において起因菌とされた *L. pneumophila* SG1 の菌株は高い病原性を有すること (ID50: 1.8~2.3 cfu/ 0.1ml) が確認された、一方、抗体価上昇の認められなかった *L. londinienis* は宿主アメーバへの感染が認められず、病原性は著しく低いもの (ID50: $>1.2 \times 10^4$ cfu/0.1ml) と考えられた。ID50 は、感染時におけるレジオネラの病原性を定量的に解析することが可能であるという点で、より実的な活用が期待される。

12. ATP 測定による入浴施設の汚染度のモニタリング

神奈川県内の温泉施設の浴槽水を対象にして、従属栄養細菌数、一般細菌数、レジオネラ属菌数および ATP 量を測定した。清掃直後は各菌とも非常に少ないか、検出限界以下であったが、2 日目にはそれぞれ増加し、3 日目にピークに達した。ATP 量は従属栄養細菌数および一般細菌数にほぼ並行していた。従属栄養細菌数計数用の R2A 寒天平板培地から複数の従属栄養細菌を分離し、10 倍希釈の菌濃度段階希釈浮遊液の ATP 量を測定したところ、どの菌株でも菌数と ATP 量は相関していた。これらの結果から、浴槽水の菌濃度あるいは汚れの度合いの指標として ATP 量を利用することの可能性が示唆された。

13. 酸性泉由来レジオネラ株に対する温泉水の作用

平成 17 年度・18 年度の「か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」総合研究報告書の中では、pH 6 未満の酸性泉及び泉温 55℃ 以上では、ほとんどレジオネラが検出されないことが報告されている。しかしながら、酸性泉から *L. pneumophila* (以下 Lp) 以外のレジオネラ属菌が、ごくまれに検出されることがある。今回、酸性泉の温泉水から分離された 3 株の *Legionella sainthelensi* (以下、Ls) を用いて、掛け流し式温泉として利用されている代表的な酸性泉の温泉水の Ls 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及び源泉水に、Lp (基準株) 及び Ls の培養菌を添加し、菌を温泉水に接触させたところ、1~6 時間経過後には菌数が減少した。このことから、酸性泉では、源泉水及び浴槽水のいずれにおいても、Ls に対しても殺菌効果を有することが分かった。さらに、pH 2.0 の希硫酸溶液を用いた酸性条件下において、これらの菌株に対するマンガンイオン及びヨウ素イオンの影響を検討した。Lp はマンガンイオン濃度とヨウ素イオン濃度の相互の作用により 60 分間経過後の菌数の減少がみられたが、Ls はマンガンイオン濃度の影響を受けにくく、ヨウ素イオン濃度が 0.3mg/L 以上にならないと菌数の減少は認められなかった。酸性泉由来の Ls は、菌を単独で酸性泉に接触させた場合、ヨウ素イオン等の存在が殺菌に重要であると考えられた。

D. 結論

1. 遺伝子検査によるレジオネラ検査法について検討し、温泉水を考慮した DNA 抽出法を確立した。市販されて

- いる遺伝子検査用試薬キットの性能試験を行なったところ、リアルタイム PCR および LAMP 法による菌数測定が可能となり、その際、示される菌数は今回基準株とした *L. pneumophila* 80-045 株 (30℃、4 日間培養) に換算した菌数で表わすことができた。また、両検査キットはわが国に分布するレジオネラ属菌をほとんど網羅的に検出できることが示された。
2. 浴槽水 366 試料からのレジオネラ属菌検出率は培養法で 15.8%、LAMP 法で 41.3%、qPCR 法で 44.0%であった。LAMP 法及び qPCR 法は培養法に比較して高い陽性率を示し、qPCR 法の感度が LAMP 法より高いためと思われた。
 3. 浴槽水の検査で、LAMP 法及び qPCR 法に強い阻害がかかった場合、前処理を工夫して(酵素溶菌法、洗浄、希釈、酵素処理時間の延長)阻害を回避することができることが判明した。
 4. 培養法と qPCR 法の定量値に相関は認められなかった。特に、高濃度の遊離残留塩素を含む試料は培養法では平常時のレジオネラ属菌数を把握できないと思われた。qPCR 法は遊離残留塩素の濃度に関わらず、レジオネラ属菌の遺伝子量を定量することが可能で、管理状態を把握するのに優れた手法である。
 5. 浴槽水のメンブランフィルター濾過と遠心沈殿によって得られた 2,000 倍濃縮菌液から、DNA を抽出・精製し、それを用いた核酸検出法 (qPCR 法と LAMP 法) でレジオネラ属菌数の定量測定を行うことができた。特に、レジオネラ属菌数が $10^2 \sim 10^3$ CFU/100mL 以上の浴槽水においては、核酸検出法と培養法の菌数に相関がみとめられた。
 6. 培養法の水質基準だけでは衛生状態及び管理状態の把握が不可能であり、遺伝子を利用した検査手法を取り入れる必要がある。
 7. qPCR 法の検量線は直線性が高いのに比べ、LAMP 法では検量線の作成が困難で、検出感度に影響を与えていた。
 8. 循環式モデル浴槽の実験から、qPCR 法を用いて、適切な塩素管理がされ、菌検出がない期間と、無殺菌循環で菌数の増加した期間の菌数の変化を正確につかむことができた。qPCR 法は現場の浴槽水のレジオネラ属菌検査に充分応用できることが示された。
 9. 今後は、死菌 DNA によると思われる核酸検出法の陽性反応を衛生管理上どう評価していくか、洗浄殺菌実験などでの検討が必要と思われた。
 10. 精製 DNA を凍結保存する検量線作成方法は、サイクリングプローブ法を用いたリアルタイム PCR 法において有用である。
 11. Ethidium monoazide (EMA) と PCR のコンビネーションによりレジオネラの生菌と死菌の区別でき、生菌のみ検出できた。この方法で培養法で得られるものと同様の結果を迅速に入手可能となった。
 12. わが国の *L. pneumophila* 臨床分離株 61 株について SBT 法を用いて型別したところ、39 種類に型別され、その疫学的有用性が確認できた。また、30 種類が日本特有の型であった。
 13. 日本各地の土壌から分離された *Legionella pneumophila* 33 株と都内の給湯水分離株 12 株について *flaA* 遺伝子の塩基配列の差異に基づく型別を行い、以前調べた浴槽水、冷却塔水と比較した。給湯水分離株は浴槽水分離

株と *flaA* 型の傾向はよく似ているものの、冷却塔水分離株で最も多い *flaA1* 型も検出されることが明らかとなった。土壌株は給湯水や浴槽水分離株と共通の *flaA* 型も見られるものの *flaA5* など独自の *flaA* 型も見られることが明らかとなった。

14. 分離集落の形態的特徴を利用して検査を行うことにより、他の雑菌等が多数認められた分離平板上からでも、レジオネラ属菌の存否を高い確率で確認することができ、また効率良く釣菌することができた。
15. 1枚のディスクに含まれる菌数が *L.pneumophila* 1群が 10³CFU のもの（試料 1）と、*L.pneumophila* 5群が 10⁵CFU（試料 2）のディスクを作製し外部精度管理を試行した。このディスクを郵送で配布したところ、試料 1 では、各機関で行っているレジオネラ属菌検査法ではほとんど検出することができず、試料 2 でも、各機関の回収率は、6.4~21.8%と少なかった。
16. 複数の基準株より抽出した DNA のマイクロプレートへの固定の方法を検討し、代表的なレジオネラ属菌を DDH 法により同定できることを確認した。
17. これまで開発した ID50（50%infectious dose、50%感染濃度）による解析法を用いて、レジオネラ属菌株の病原性を調べた。菌種では *L.pneumophila* が最も病原性が高く（ID50: 1.1~4.4 cfu/0.1ml）、2002 年の宮崎県集団感染事例において、浴槽に多数検出されたにも関わらず抗体価上昇の認められなかった *L.londinienis* は宿主アメーバへの感染が認められず、病原性は著しく低い（ID50: >1.2x10⁴ cfu/0.1ml）と考えられた。
18. 温泉施設の浴槽水を対象にして、従

属栄養細菌数、一般細菌数、レジオネラ属菌数および ATP 量を測定した。ATP 量は従属栄養細菌数および一般細菌数にはほぼ並行し、浴槽水の菌濃度あるいは汚れの度合いの指標として ATP 量を利用することの可能性が示唆された。

19. 酸性泉の温泉水から分離された 3 株の *Legionella saintthelensi*（以下、Ls）を用いて、掛け流し式温泉として利用されている代表的な酸性泉の温泉水の Ls に対する作用について調べた。この酸性泉の浴槽水では、Ls に対しても殺菌効果を有することが分かった。*L.pneumophila* はマンガンとヨウ素の両イオン濃度の相互的作用により 60 分間経過後の菌数の減少がみられたが、Ls はマンガンイオン濃度の影響を受けにくかった。
20. 入浴施設の衛生管理事例として、1) 浴槽間仕切り板からの菌の検出と ATP 拭き取り検査の有用性、2) 冷却装置構造と内部汚染の事例を紹介した。

E. 健康危険情報
なし。

F. 研究発表

- 1) Kura F, Amemura-Maekawa J, Suzuki-Hashimoto A, Chang B, Izumiyama S, Ichinose M, Endo T, and Watanabe H. Surveillance of *Legionella* isolates from bathtub water in Japan: A increase of the rate of *Legionella pneumophila* serogroup 1 among *Legionella* isolates. 22nd Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Uppsala, Sweden. June 2007.
- 2) Suzuki-Hashimoto A, Amemura-Maekawa

J, Kura F, Chang B, Izumiyama S, Ichinose M, Endo T, and Watanabe H. The surveillance of *Legionella* from cooling towers between 2001 and 2006 in Japan. 22nd Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Uppsala, Sweden. June 2007.

- 3) 鈴木敦子、前川純子、倉 文明、常 彬、泉山信司、市瀬正之、渡辺治雄、遠藤卓郎. 冷却塔水からのレジオネラ属菌の検出状況—2001 年度から 2006 年度まで— 第 81 回日本感染症学会総会. 京都、 2007 年 4 月.
- 4) 倉 文明、前川純子、鈴木敦子、常 彬、泉山信司、市瀬正之、遠藤卓郎、渡辺治雄. 浴槽水からのレジオネラ属菌の検出状況—*Legionella pneumophila* 血清群 1 の増加— 第 81 回日本感染症学会総会. 京都、 2007 年 4 月

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

表1. リアルタイムPCRおよびLamp法の検出特異性

ID-No	Species	Serogroup or Biotype	Clinical or Environmental	Designation	ATCC	qPCR	Lamp
1	NIIB0145 <i>L. adelaidensis</i>		E	1762-AUS-E	49625	-	-
2	NIIB0040 <i>L. arisa</i>		E	WA-316-C3	35292	+	+
3	NIIB0405 <i>L. beliardensis</i>		E	Montbeliard A1	700612	-	+
4	NIIB0057 <i>L. birminghamensis</i>		C	1407-AL-H	43702	+	-
5	NIIB0009 <i>L. bozemarii</i>	1	C	WIGA	33217	+	+
6	NIIB0687 <i>L. bozemarii</i>	2	C	Tronto-3	35545	+	+
7	NIIB0114 <i>L. bruenensis</i>		E	441-1	43878	+	-
8	NIIB1254 <i>L. busanensis</i>		E	KCTC 12084, K9951	700610	-	+
9	NIIB0047 <i>L. cherrii</i>		E	ORW	35252	+	+
10	NIIB0113 <i>L. circumdatensis</i>		C	72-OH-H	43753	+	+
11	NIIB0417 <i>L. donaldsonii</i>		C	MDA 2706	BAA-693	+	+
12	NIIB0406 <i>L. drozanski</i>		E	LLAP-1	700990	-	+
13	NIIB0078 <i>L. dumoffii</i>	BT-1	E	NY 23	33279	+	+
14	NIIB0234 <i>L. gormanii</i>		E	LS-13	33297	+	+
15	NIIB0049 <i>L. erythra</i>	1	E	SE-32A-C8	35303	+	+
16	NIIB0146 <i>L. fairfieldensis</i>		E	1725-AUS-E	49588	-	+
17	NIIB0408 <i>L. fallonii</i>		E	LLAP-10	700992	+	+
18	NIIB0688 <i>L. feeleii</i>	1	E	WO-44C	35072	+	+
19	NIIB0689 <i>L. feeleii</i>	2	C	691-WI-H	35849	+	+
20	NIIB0193 <i>L. geestiana</i>		E	1308	49504	(+)	-
21	NIIB0147 <i>L. gratiana</i>		E	Lyon 8420412	49413	+	+
22	NIIB0404 <i>L. gresilensis</i>		E	Gre'boux 11D13	700509	-	+
23	NIIB0690 <i>L. hackeliae</i>	1	C	Lansing 2	35250	+	+
24	NIIB0691 <i>L. hackeliae</i>	2	C	798-PA-H	35999	+	+
25	NIIB0053 <i>L. israelensis</i>		E	Bercovier 4	43119	-	-
26	NIIB0046 <i>L. jamestowniensis</i>		E	JA-26-G1-E2	35298	+	+
27	NIIB0014 <i>L. jordania</i>		E	BL-540	33623	+	+
28	NIIB0148 <i>L. lansingensis</i>		C	1677-MI-H	49751	+	+
29	NIIB0194 <i>L. lordinensis</i>	1	E	1477	49505	-	-
30	NIIB1255 <i>L. lordinensis</i>	2	E	Mulhouse B26	BAA-518	-	-
31	NIIB0692 <i>L. longbeachae</i>	1	C	Long Beach 4	33462	+	+
32	NIIB0693 <i>L. longbeachae</i>	2	C	Tucker 1	33484	+	+
33	NIIB0045 <i>L. maceachernii</i>		E	PX-1-G2-E2	35300	+	+
34	NIIB0008 <i>L. micdadei</i>		C	TATLOCK	33218	+	+
35	NIIB0116 <i>L. moravica</i>		E	316-36	43877	+	-
36	NIIB0195 <i>L. nautarum</i>		E	1224	49506	+	+
37	NIIB0036 <i>L. oakridgensis</i>		E	OR-10	33761	-	+
38	NIIB0042 <i>L. parisiensis</i>		E	PF-209C-C2	35299	+	+
39	NIIB0001 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	1	C	Philadelphia-1	33152	+	+
40	NIIB0002 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	2	C	Togus-1	33154	+	+
41	NIIB0003 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	3	E	Bloomington-2	33155	+	+
42	NIIB0004 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	4	C	Los Angeles-1	33156	+	+
43	NIIB0005 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	5	E	Dallas 1E	33216	+	+
44	NIIB0150 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i>	5	E	U8W	33737	+	+
45	NIIB0006 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	6	C	Chicago 2	33215	+	+
46	NIIB0033 <i>L. pneumophila</i>	7	E	Chicago 8	33823	+	+
47	NIIB0034 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	8	C	Concord 3	35096	+	+
48	NIIB0304 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	9	E	IN-23-G1-C2	35289	+	+
49	NIIB0050 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	10	C	Leiden 1	43283	+	+
50	NIIB0051 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	11	C	797-PA-H	43130	+	+
51	NIIB0060 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	12	C	570-CO-H	43290	+	+
52	NIIB0061 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	13	C	82A3105	43736	+	+
53	NIIB0062 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	14	C	1169-MN-H	43703	+	+
54	NIIB0063 <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	15	C	Lansing 3	35251	+	+
55	NIIB0451 <i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-192		+	+
56	NIIB0453 <i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-206		+	+
57	NIIB0462 <i>L. pneumophila</i>	UT	E	H13-239		+	+
58	NIIB0196 <i>L. quatriniensis</i>		E	1335	49507	+	-
59	NIIB0260 <i>L. quinboarii</i>	2	E	LC870	BAA-538	+	-
60	NIIB0407 <i>L. roxborhamii</i>		E	LLAP-6	700991	+	+
61	NIIB0048 <i>L. rubrilucens</i>		E	WA-270A-C2	35304	+	+
62	NIIB0039 <i>L. sainthelehsi</i>	1	E	Mt St Helens 4	35248	+	+
63	NIIB0207 <i>L. sainthelehsi</i>	2	C	Ly176.97	700617	+	+
64	NIIB0409 <i>L. sancticusis</i>		E	SC-63-C7	35301	+	+
65	NIIB0149 <i>L. shake-spearei</i>		E	214	49655	+	-
66	NIIB0043 <i>L. spiritalensis</i>	1	E	Mt St Helens 9	35249	-	+
67	NIIB0261 <i>L. spiritalensis</i>	2	E	ML76	BAA-537	-	+
68	NIIB0041 <i>L. steigerwaltii</i>		E	SC-18-C9	35302	+	+
69	NIIB0262 <i>L. tasarinensis</i>		E	Turin I no 1	700508	+	+
70	NIIB0117 <i>L. tucsonensis</i>		C	1087-AZ-H	49180	+	+
71	NIIB0032 <i>L. wadsworthii</i>		C	81-716A	33877	+	+
72	NIIB0206 <i>L. waltersii</i>		E	2074-AUS-E	51914	+	+
73	NIIB0197 <i>L. wordeleensis</i>		E	1347	49508	+	-
74	NIIB0305 <i>Legionella</i> genomospecies 1		E	2055-AUS-E	51913	+	-
75	NIIB0306 <i>Legionella</i> sp.		E	LLAP-14	700313	-	-