

資料①

核酸検出法の手順（カラム法）

濾過濃縮

1. 検水 500mL をメンブランフィルター（直径 47mm、0.2 μ m、ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE）で吸引ろ過する。
2. 滅菌蒸留水 50mL でメンブランフィルター及びカップを洗浄し、吸引ろ過する。このとき、カップ壁面を洗うように滅菌水をピペットで流しかける。
3. 吸引終了後、フィルターを滅菌ピンセットで剥がし、50mL 滅菌コニカルチューブに入れる。
4. チューブに 5.0mL の滅菌蒸留水を加え、5分間ボルテックスする。このとき、まんべんなく滅菌水がフィルターに接触するようにチューブの角度を調節する。
5. この試料を濃縮試料とする。
6. 濃縮試料 5.0mL のうち、2.0mL を微量高速遠心機 13,000rpm 5分間、沈さ 100 μ l を得、冷凍保存(-30 $^{\circ}$ C)。
7. *Legionella* 属菌DNA回収法2の方法でDNAを精製（詳細は 070705 泉山先生資料参照。）
8. 精製DNAを95 $^{\circ}$ C、5分間加熱後、冷却試料の 5 μ l をqPCR装置（ABI PRISM 7000）、およびLAMP装置で核酸増幅。
9. 標準菌株の希釈系列から検量線（LAMP法の検量線は希釈系列で菌数の少ないものを採用すると直線性が悪くなるので、菌数の高いほうで得られた直線を採用）を作成し、試料のCt値、またはTt値（qPCR：Ct値、LAMP：Tt値 CSV ファイル 16行目に記載）をもとに試料の菌数とした。
10. 得られた菌数は試料 50mL 中の菌数に相当するので、培養法の 100mL と比較するために、核酸法の菌数を2倍にする。両者の相関を調べる。

資料②

核酸検出法の手順 (Chelex100 法)

濾過濃縮

1. 検水 500mL をメンブランフィルター (直径 47mm、0.2 μ m、ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE) で吸引ろ過する。
2. 滅菌蒸留水 50mL でメンブランフィルター及びカップを洗浄し、吸引ろ過する。このとき、カップ壁面を洗うように滅菌水をピペットで流しかける。
3. 吸引終了後、フィルターを滅菌ピンセットで剥がし、50mL 滅菌コニカルチューブに入れる。
4. チューブに 5.0mL の滅菌蒸留水を加え、5 分間ボルテックスする。このとき、まんべんなく滅菌水がフィルターに接触するようにチューブの角度を調節する。
5. この試料を濃縮試料とする。
6. 濃縮試料 5.0mL のうち、1.0mL を微量高速遠心機 15,000rpm 5 分間遠心し、上清を除去する。
7. この沈さに 5%ChelexTE(pH8.8)50 μ l を加え、ボルテックスする。このとき、均一に添加するため、Chelex はスターで攪拌しながら採取する。
8. 7 の試料を 100 $^{\circ}$ C で 10 分加熱し、15,000rpm 5 分遠心し、この上清を精製 DNA とする。
9. 精製 DNA を 95 $^{\circ}$ C、5 分間加熱後、冷却試料の 5 μ l を qPCR 装置 (ABI PRISM 7000)、および LAMP 装置で核酸増幅。
10. 標準菌株の希釈系列から検量線 (LAMP 法の検量線は希釈系列で菌数の少ないものを採用すると直線性が悪くなるので、菌数の高いほうで得られた直線を採用) を作成し、試料の Ct 値、または Tt 値をもとに試料の菌数とした。
11. 得られた菌数は試料 10mL 中の菌数に相当するので、培養法の 100mL と比較するために、核酸法の菌数を 10 倍にする。

資料③

核酸検出法の手順（アルカリ熱抽出法）

1. 濾過濃縮検水 500mL をメンブランフィルター（直径 47mm、0.2 μ m、ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE）で吸引ろ過する。
2. 滅菌蒸留水 50mL でメンブランフィルター及びカップを洗浄し、吸引ろ過する。このとき、カップ壁面を洗うように滅菌水をピペットで流しかける。
3. 吸引終了後、フィルターを滅菌ピンセットで剥がし、50mL 滅菌コニカルチューブに入れる。
4. チューブに 5.0mL の滅菌蒸留水を加え、5分間ボルテックスする。このとき、まんべんなく滅菌水がフィルターに接触するようにチューブの角度を調節する。
5. この試料を濃縮試料とする。
6. 濃縮試料 5.0mL のうち、1.0mL を微量高速遠心機 15,000rpm 5分間遠心し、上清を除去する。
7. この沈さに 25mM NaOH 43.1 μ l を加え、ボルテックスする。
8. 7の試料を 100 $^{\circ}$ C で 10分加熱し、15,000rpm 5分遠心し、2/25M Tris-HCl (pH7.0) 6.9 μ l を添加(中和)する。
9. 8の試料を 15,000rpm 5分遠心し、この上清を精製DNAとする。
10. 精製DNAを 95 $^{\circ}$ C、5分間加熱後、冷却試料の 5 μ l を qPCR 装置 (ABI PRISM 7000)、および LAMP 装置で核酸増幅。
11. 標準菌株の希釈系列から検量線（LAMP法の検量線は希釈系列で菌数の少ないものを採用すると直線性が悪くなるので、菌数の高いほうで得られた直線を採用）を作成し、試料の Ct 値、または Tt 値をもとに試料の菌数とした。
12. 得られた菌数は試料 10mL 中の菌数に相当するので、培養法の 100mL と比較するために、核酸法の菌数を 10倍にする。

[E]

汚染事例と原因究明

事例1 ATPふき取り検査による浴槽等汚染箇所の把握

(1) 浴槽終い湯のレジオネラ属菌等検査から

17年9月に実施した浴槽終い湯の検査結果からは、湯口からの汚染は見当たらないが、終い湯浴槽水からは、環境由来微生物であるレジオネラ属菌、アメーバと、大腸菌等糞便由来微生物、ヒト由来微生物である緑膿菌等が検出した。特に従属栄養細菌等清浄度指数が湯口からのものと比べれば極端に多く検出されている。このことから汚染はヒト持ち込みによる汚染の疑い、構造的な浴槽汚染の疑い、浴槽清掃時の死角等が関係する汚染の疑い等を想定し、浴槽清掃消毒等衛生管理の徹底を指導。後日、再検査の実施を指示した。併せて、貯湯槽、配管等の清掃消毒を行うよう指導した。

(2) ニヵ月後の再検査から

施設では配管、貯湯槽、浴槽等清掃消毒作業の実施、採水した浴槽終い湯から再び、レジオネラ属菌検出が検出した。再検査の結果からレジオネラ属菌はヒト持ち込みは考えられず、従属栄養細菌数増加等を踏まえれば浴槽自体の汚染としかいえない。具体的には浴槽清掃時にバイオフィーム等剥ぎ取りが出来なかった等、又は清掃不備、若しくはその他死角存在を想定しなければならない。その一つに考えられる木製間仕切り板の存在がある。木製が故に衛生管理が難しく汚染要因に挙げられる。

そこで再々検査に向け、浴槽清掃時の死角存在等の具体的確認のため浴槽のATPふき取り検査を実施することにした。

(3) 岩風呂、タイル風呂におけるATPふき取り検査から ※

ふき取り箇所	清掃前	清掃後
1 丸太裏壁面	21,750	16,007
2 丸太裏 浴槽壁面	9,062	19,504
3 湯口下側タイル	32,772	4,996
4 タイル目地	69,207	25,427
5 タイル表面A	53,420	560

6 タイル表面C	24,371	93
7 タイル壁面B	52,522	20,499
8 タイル壁面立上	56,583	57,2065 ※1
9 排水口内側	9,524	90
10 排水口蓋裏面	8,029	713
11 丸太裏洗場側	44,742	16,481

12 丸太裏浴槽壁面	54,619	12,556
13 湯口下側	58,208	2,952
14 石表面	24,527	163
16 石表面亀裂有	48,482	2,857

19 湯口下岩	1,615	2,913
121 石表面	10,364	2,118
22 排水口金具	15,594	7,412
23 石との隙間	20,903	18,566

※ 1～9はタイル風呂、10～23は岩風呂 ※1 再度ブラシ洗浄後のATP検査では4,149に減少

(5) ATPふき取り検査結果から浴槽清掃時の死角等について

- ① 浴槽内部清掃時に、清掃未実施部位、又は清掃不備等清掃時に死角存在有り。
- ② 清掃等死角は全ての浴槽材質に存在する。
- ③ 清掃時は凸凹面、石陰、破損箇所、湯口周辺、排水口周辺、目地、縦壁面、隅、付属物等（※1）に注意が必要である。
- ④ その他関連するもの（※2）

※1 水位測定計、温度計、ジェット装置、連通管、間仕切り板等想定。

※2 ガラン、シャワーヘッド、打たせ湯、自動残塩素計取付け配管、さらに想定される汚染原因等は「HACCPの視点に基づく重要なポイント一覧」参照。

（井上博雄、平成18年度厚生労働科学研究事業 総括・分担研究者報告書）

(6) まとめ

- ① 衛生管理は定期的な清掃消毒が最低条件
- ② 衛生管理は施設・設備構造上の問題・課題把握、汚染実態把握が重要（HACCPの視点）
- ③ ATPふき取り検査は簡易かつ汚染実態等を直接確認でき衛生管理上有効

事例 2 冷却装置構造と内部汚染

源泉温度が高温のため入浴適温にするために浴槽前後において加水等が必要となる。加水となれば、改正温泉法の規定により加水が義務表示となり、(1)「完全源泉掛け流し」のイメージダウンの恐れを懸念する施設管理者が多い。(2)加水に係る経費削減、(3)湯けむりがもつ温泉情緒を高揚する要素がある。そのため高温泉の温泉地は、源泉水を貯湯槽に入れる前又は浴槽手前で浴槽温度が適温になるよう一定度湯音を下げ、加水を極力抑える手段として冷却装置（冷却棟）等の設置、又は古典的な方法である木枠組み流し等で自然外気又は冷気を取り込む装置とか、熱交換作用を活用する等思考を凝らしている。

今回、冷却装置内部構造の汚染が原因とする汚染事例を紹介する。

(1) 汚染原因究明に至る経緯

施設からレジオネラ属菌検査の依頼を受けた。検査結果【表 1 参照】は湯口から 10cfu/100ml レジオネラ属菌が検出した。次回まで源泉から浴槽湯口に至る清掃消毒を指示し、再検査を要請した。再検査では清掃直後の浴槽水から 180cfu/100ml レジオネラ属菌が検出した。再度浴槽を含む清掃消毒の徹底と再々検査を指示した。施設配管図等から重点的に清掃消毒等衛生管理の指示をしたにもかかわらず、再々検査でも清掃後の湯口と浴槽からレジオネラ属菌検出した。その後、現地立ち入りを行い、施設の衛生管理状況確認、及び図面上に存在しない冷却棟を確認したので、汚染原因と想定される冷却棟内部清掃消毒後の再々再検査するよう指示した。再々再検査の結果から汚染原因は冷却装置（冷却棟）と究明した。

(2) 現地調査で冷却装置（冷却棟）の確認と指導

再々検査でも清掃後の湯口と浴槽からレジオネラ属菌が検出したことから、図面上に存在しない施設とか、付属物等存在有無確認のため現地調査し図面上記載ない冷却棟を確認し清掃消毒等状況及び冷却装置の内部構造等の点検確認を行った。

冷却棟内部の清掃は行っていないとの回答なので、冷却棟の扉を開け内部を観察したところ汚泥、スケール、バイオフィームで埋めつくされた状態を確認した。この冷却棟は冷却構造上、分解し部品を外して清掃するには専門業者でなければ出来ない構造である。この時点で汚染原因は冷却棟内部構造が原因と想定した。そのため、早期に冷却棟の清掃消毒を実施し、その後、冷却棟水のレジオネラ属菌検査を実施するよう指導した。

管理者に対しては衛生管理上、正確な図面を引き、源泉から浴槽に至る全ての箇所に対して定期的に清掃消毒の実施を衛生管理の視点から促がした。

(3) 冷却装置（冷却棟）について【説明 1 参照】

- 当施設冷却装置は衛生管理上難しい構造上と判断する。
- ◎ 冷却棟（冷却装置）の問題点【説明 2 参照】
 - ① 商品化されている冷却装置（又は特注）は、構造上装置部品等を簡単に取り外せないものが多い。

② そのため、施設において分解清掃消毒等衛生管理面において、面倒、手間ひま等定期的に清掃消毒がなされていない施設がある。

③ これら冷却装置構造は衛生管理上、死角があり重大な問題と指摘する。

(4) 冷却装置に係る衛生管理について

- 冷却装置は外気温度を利用して高温源泉の湯温を下げる構造をもつため、環境由来微生物（レジオネラ属菌、アメーバ等）による汚染が懸念される。
- 冷却装置は定期的な清掃消毒が衛生管理上重要である。
- 衛生管理上、冷却装置の構造は装置部品が簡単に取り外し可能でなければならない。例えば、ユニット構造、構造簡素化、逆洗構造等。
- 源泉から浴槽、排水までHACCPの視点に基づく衛生管理が必要不可欠な条件である。

表 1

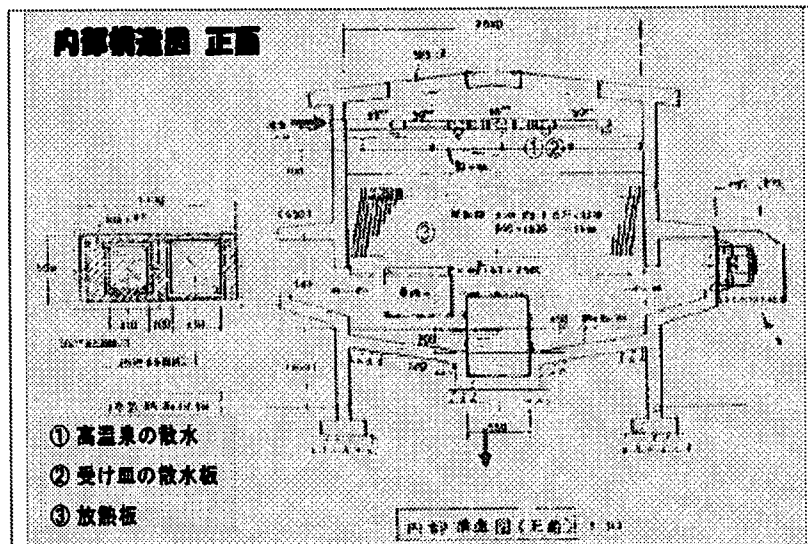
採水	採水場所	レジオネラ属菌	血清型	備 考
18. 11.10	源泉	10cfu/100ml	L.p.SG2	検査依頼、行政指導開始、○源泉、貯湯槽、配管、浴槽等清掃指示
	浴槽水	10cfu/100ml以下		
12.12	貯湯槽	10cfu/100ml以下	UT	○施設内配管、浴槽等清掃消毒指示
	浴槽水	180cfu/100ml		
19. 1.12	湯口	10cfu/100ml	1	○清掃点検漏れの有無確認、施設内配管、浴槽等清掃消毒指示
	浴槽水		UT	
1.25	※保健所立入(現地確認と衛生指導)⇒管理者、清掃業者立会⇒図面上記載ない冷却棟を確認。冷却棟汚染状態確認、翌朝冷却棟から採水、レジオネラ属菌検査指示。			
1.26	冷却棟 (冷却装置)	10cfu/100ml	1,2, UT (PFGE同一)	○汚染箇所は冷却棟 ○冷却棟の清掃消毒後の検査指示
2.13	冷却棟	10cfu/100ml以下		※冷却棟の清掃消毒後はレジオネラ属菌検出せず。 ●各種部品等は簡単に取り外しが出来ない構造であるため清掃消毒等衛生管理が難しい構造である。
	湯口			
	浴槽水			

説明 1

※ 全国的に冷却装置（冷却構造）は多く存在する。

- (1) 竹板木材石等のくりめき 又は 石等を並べて高温泉水を長い距離流して冷ます方法を利用した構造 (注: 竹板等なし、直挿付)
- (2) 段々階段式 (土間、壁面、天井) (注:)
- (3) 床暖、無散水道路等経由 (注: 床暖、二次利用)
- (4) 商品化されている冷却装置 (注:)

説明 2



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

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

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

A. 研究目的

PCR 法は臨床検体や環境からレジオネラを検出するために使用されているが、死菌を検出することが欠点である。Ethidium monoazide (EMA) は特異的に死菌の損傷された細胞膜を透過し、その菌の染色体 DNA に結合し、光照射により DNA を切断することができる。我々は EMA のこの特性を利用し、PCR によって生きているレジオネラの DNA の存在を特異的に検出でき、生菌のみを検出する方法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

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℃ 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 μ g/ml を添加し、遮光下 4℃ 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。

C. 研究結果

PCR の結果を図1で示している。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 による検出された (Lane 1)。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 (Lane 2)。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 (Lane 3) と塩素処理死菌 (Lane 4) 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。

D. 考察

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。本研究で EMA および PCR のコンビネーションの使用によりレジオネラ生菌のみ検出できることが証明された。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。この方法でレジオネラ生菌を迅速検出することが可能となった。

L. pneumophila

Serogroup 1
患者由来株



Serogroup 1
浴槽水由来株



Serogroup 1
冷却塔水由来株



Serogroup 5
浴槽水由来株



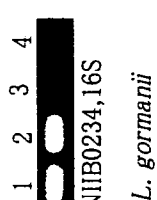
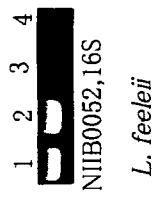
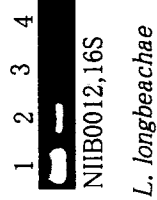
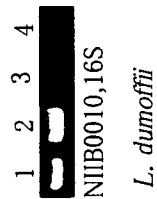
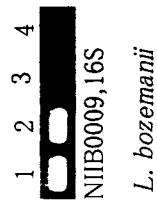
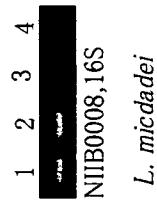
Serogroup 6
浴槽水由来株



Serogroup 7
冷却塔水由来株



L. pneumophila
以外のレジオネラ属菌



1: 生菌, EMA未処理
2: 生菌, EMA 20 µg/ml
3: 熱処理した死菌, EMA 20 µg/ml
4: 塩素処理した死菌, EMA 20 µg/ml

図1. 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 結果

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

Legionella pneumophila 臨床分離株の遺伝子型の解析

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

研究要旨： 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。

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た。収集された *Legionella pneumophila* 20 株について遺伝子型別を行った。過去において収集、型別された 41 株の臨床分離株も合わせて、遺伝子型別の疫学的

有用性を確認するとともに、年次的な型別の動向を見た。

B. 研究方法

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¹⁾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²⁾。*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* はスレオニン生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-bisemialdehyde 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)、*neuA* は *N*-acylneuraminate cytidylyl transferase をそれぞれコードする遺伝子である。7遺伝子の遺伝子型が決まった分離株を EWGLI のデータベースに登録すると、新しい遺伝子型の組み合わせについては ST (Sequence Type)ナンバーが付与される。

以前型別を行った臨床分離株41株についても *neuA* 遺伝子の型別を追加し、61株を EWGLI のデータベースに登録した (3株は登録作業中)。今回報告する61株はすべて独立の事例に由来するもので、わが国初めてのレジオネラ症患者からの分離株 (1980年) から、2007年までに得られた分離株で、1999年までのものが33株 (正確な分離年が不明の株1株を含む)、2000年以降のものが28株である。患者については、男女比は男性が93%、年齢分布は0-79歳で、平均年齢は58.4歳であった。

C. 研究結果および考察

1. ST型の分布

SBTにより臨床分離株61株 (血清群1が57株、血清群5が3株、血清群3が1株) は39種類に型別された (表1)。血清群5の3株は *neuA* が増幅されず、6遺伝子による型別となった。ST1が6株、ST23、ST120、ST306がそれぞれ4株ずつ存在した。2株ずつ存在したSTは8種類あった。残りの27種類は1株のみであった。

ST1の株は全国各地から分離されているが、1994年以降は検出されていない。ST306の4株は2002年以降の分離で、うち3株が特定の地域の比較的近い時期に分離されている。それ以外の複数株分離されたSTについては分離年も、地域についても特に偏りは見られなかった。

2. EWGLIのデータベースとの比較

EWGLIのデータベースには2008年3月1日現在で32の国あるいは地域に由来する978株の遺伝子型が登録され、そのST型は300種類を大きく超えている。

EWGLIのデータベースによると、我が国の臨床分離株でもっとも多いST1型の株はヨーロッパにも広く分布しており、環境からも患者からも最も高い頻度で検出される。

4株が記録されたST23もヨーロッパに広く分布しており、我が国においては大きな2つの集団感染事例^{3,4)}の起因菌株の型である。ST120とST306も4

株あるが、これらは日本以外での報告例はない。

2株ずつ存在した8種類のSTのうち、7種類は日本特有の型で、1種類のみがヨーロッパに広く、またアメリカ合衆国にも存在した。

1株ずつであった27種類のSTについては21種類が日本特有であり、6種類がヨーロッパや北アメリカで報告があったが、報告数はいずれも多くなかった。

3. ST型と感染源との関連

日本国内の冷却塔水由来株の7割以上はST1で、現在もよく検出される。一方浴槽水からのST1型の株検出頻度は1割未満である(未発表データ)。わが国において近年はST1型の臨床株が分離されなくなっている。衛生管理の徹底で冷却塔水からのレジオネラの検出頻度が年を追うごとに減少していることが関係しているかもしれない^{5,6)}。

昨年度の厚生労働科学研究班の報告⁷⁾において、SBTに用いられる遺伝子の1つである*flaA*の遺伝子型別を浴槽水分離株167株と冷却塔水分離株128株について行ったところ、冷却塔水分離株は、*flaA1*と*flaA11*が多く、浴槽水分離株は、*flaA2*, 3, 4, 6, 7, 10, 12が多かった。今回調べた臨床分離株61株のうち浴槽水分離株タイプの*flaA*型であるのは50株だった。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割以上の推定感染源が温泉などの入浴施設となっている⁷⁾。その推定と矛盾しない結

果である。また、浴槽水分離株タイプだった50株のうち17株は実際に感染源が浴槽だと確定あるいは推定されている。

D. 結論

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。

謝辞

今回解析した菌株を分与くださった伊藤 穰、上野伸弘、瓜生佳世、大谷勝実、河野喜美子、久保園祥子、小林敬典、斉藤 厚、嶋田直美、清水 寧、杉山寛治、舘田一博、古田紀子、堀川和美、増子京子、藪内英子(敬称略)の諸氏に感謝いたします。

E. 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) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. 2007. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus

discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 45:1965-8.

- 3) Nakamura H, Yagyu H, Kishi K, Tsuchida F, Oh-ishi S, Yamaguchi K and Matsuoka T. 2003. A large outbreak of Legionnaires' disease due to an inadequate circulating and filtration system for bath water--epidemiologic manifestations. *Intern. Med.* 42:806-11.
- 4) 河野喜美子、岡田美香、倉 文明、前川純子、渡辺治雄：循環式入浴施設における本邦最大のレジオネラ症集団感染事例 II. 診断検査法の比較. *感染症学雑誌*. 81, 173-182, 2007.
- 5) 鈴木敦子、市瀬正之、松江隆之、天野祐次、寺山 武、泉山信司、遠藤卓郎. 2002. 各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況-1996年4月から2000年11月まで- *感染症学雑誌* 76:703-10.
- 6) 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.
- 7) 倉 文明、前川純子、遠藤卓郎、常彬、鈴木敦子、市瀬正之. 2007. 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. 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」 平成 18 年度総括・分担研究報告書 pp37-43.

F. 研究発表

- 1) Kura F, Amemura-Mackawa 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-Mackawa 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.

G. 知的所有権の取得状況
なし。

表1. 日本各地から分離された*Legionella pneumophila* 臨床分離株のSBT

NIB No.	SG	flaA	pilE	asd	mic	mompS	prod	neuA	ST	Isolate	Prefecture	Age	Sex	Infectious origin	Area
80	1	1	4	3	1	1	1	1	1	1981	Nagasaki	50	female		pan Europe
83	1	1	4	3	1	1	1	1	1	1983	Nagasaki	44	female		pan Europe
97	1	1	4	3	1	1	1	1	1	1987	Nara	56	male	shower (suspected)	pan Europe
101	1	1	4	3	1	1	1	1	1	1989	Ishikawa	70	male		pan Europe
103	1	1	4	3	1	1	1	1	1	1990	Chiba	0	male		pan Europe
169	1	1	4	3	1	1	1	1	1	1994	Saitama				pan Europe
190	1	1	4	3	10	1	1	1	134	1993	Okinawa	42	male		unique
84	1	2	3	9	10	2	1	6	23	1983	Fukuoka	61	male		pan Europe
292 *	1	2	3	9	10	2	1	6	23	2000	Ibaraki	58	male	Bath (confirmed)	pan Europe
374 *	1	2	3	9	10	2	1	6	23	2002	Miyazaki	54	male	Bath (confirmed)	pan Europe
2300	1	2	3	9	10	2	1	6	23	2004	Fukuoka	54	male		pan Europe
172	1	2	3	18	5	5	1	2	92	1994	Tokyo	43	male		England
89	1	2	3	5	11	2	1	6	120	1986	Shizuoka	70	male		Japan only
96	1	2	3	5	11	2	1	6	120	1987	Okayama	61	male		Japan only
170	1	2	3	5	11	2	1	6	120	1996	Tokyo	59	male		Japan only
2139	1	2	3	5	11	2	1	6	120	2002	Yamagata	57	male		Japan only
90	1	2	10	3	10	9	4	6	121	1986	Hokkaido	48	male		unique
106	1	2	3	10	11	2	1	6	123	1991	Tokyo	70	male		Japan only
110	1	2	3	10	11	2	1	6	123	1991	Yamanashi	78	male		Japan only
168	1	2	1	6	15	2	1	6	132	1996	Tokyo	63	male		unique
294	1	2	3	18	11	2	10	12	140	2000	Nagano	56	male	Bath (suspected)	unique
141	1	2	10	3	13	9	4	18	142	1993	Tokyo	54	male		Japan only
2301	1	2	10	3	13	9	4	18	142	2002	Kagoshima	23	female	Bath (confirmed)	Japan only
2298	1	2	10	9	10	2	1	6	299	2006	Fukuoka	54	male		unique
2306	1	2	10	3	12	9	4	9	301	2006	Miyazaki	54	male	Bath (suspected)	unique
2145	1	2	3	18	12	2	1	6	309	2006	Yamagata	48	male		unique
2143	1	2	3	9	10	2	1	10	IP	2005	Yamagata	57	male	Bath (suspected)	unique
107	1	3	4	1	1	14	9	1	36	1990	Nagasaki	79	female		Germany and US
99	1	3	6	1	6	14	11	9	114	1987	Tokyo	40	male		Netherlands
164	1	3	6	1	3	5	11	11	130	1996	Tokyo	55	male		unique
191	1	3	4	1	1	14	9	6	IP	1995	Okinawa	72	male		unique
2137	5	3	12	1	6	14	9	0	NA	2001	Yamagata	77	male	Bath (suspected)	Japan only
2299	5	3	12	1	6	14	9	0	NA	2007	Gifu	55	male	Bath (confirmed)	Japan only
81	1	4	7	11	3	11	12	9	42	1982	Saga	71	male		pan Europe and US
112	1	4	7	11	3	11	12	9	42		Tokyo				pan Europe and US
171	1	4	17	11	23	5	12	19	143	1996	Saitama	58	male		England and Canada
2305	1	4	8	11	23	34	12	6	300	2006	Miyazaki	61	male		unique
301 *	1	6	10	19	3	19	4	9	2	2000	Shizuoka	66	male	Bath (confirmed)	Switzerland
102	1	6	10	15	13	17	14	11	122	1988	Nara	78	male		Japan only
2144	1	6	10	15	13	17	14	11	122	2005	Yamagata	68	male		Japan only
166	1	6	10	21	13	17	14	11	131	1996	Tokyo	73	male		unique
178	1	6	10	15	6	30	14	9	133	1996	Kagoshima	70	male		unique
263	1	6	10	15	13	4	14	11	139	2000	Yamagata	43	male	Bath (suspected)	Japan only
2140	1	6	10	15	13	4	14	11	139	2002	Yamagata	67	male	Pool (confirmed)	Japan only
2302	1	6	10	15	20	21	14	6	298	2003	Kagoshima	60	male	Bath (confirmed)	unique
2138	1	6	10	15	13	9	14	11	306	2002	Yamagata	58	male	Bath (confirmed)	Japan only
2141	1	6	10	15	13	9	14	11	306	2003	Yamagata	68	male	Pool (suspected)	Japan only
2142	1	6	10	15	13	9	14	11	306	2003	Yamagata	54	male	Bath (suspected)	Japan only
2317	1	6	10	15	13	9	14	11	306	2007	Kagoshima	59	male	Bath (confirmed)	Japan only
2303	1	6	10	19	14	4	4	3	307	2006	Fukuoka	77	male		unique
1261	1	6	10	19	15	4	4	6	IP	2003	Kyoto	60	male	Cooling tower (suspected)	unique
2136	3	6	10	19	6	19	4	6	305	2001	Yamagata	77	male	Bath (suspected)	unique
205	1	7	6	17	21	8	11	9	135	1998	Aichi	54	male		unique
189	1	8	10	3	15	8	1	6	62	1992	Okinawa	56	male		pan Europe and US
140	1	8	3	3	15	2	1	6	126	1993	Hiroshima	40	male		unique
252	1	10	12	7	3	16	18	6	138	2000	Shizuoka	58	male	Bath (suspected)	Japan only
369	1	10	12	7	3	16	18	6	138	2002	Niigata	61	male	Bath (suspected)	Japan only
79	1	12	8	11	20	5	12	6	118	1980	Nagasaki	64	male		Japan only
105	1	12	8	11	20	5	12	6	118	1990	Tokyo	64	male		Japan only
85	1	15	19	5	12	18	5	6	119	1983	Osaka	65	male		unique
2304	5	23	12	31	6	48	31	0	NA	2002	Miyazaki	52	male		unique

*: Large outbreak

NA=not applicable; IP=in progress

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

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
-浴槽水、冷却塔水および臨床分離株との比較-

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	
研究協力者	古畑勝則	麻布大学	環境保健学部

研究要旨： 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。土壌由来株の *flaA* 遺伝子型は、一部浴槽水由来のものと重なっていたが、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。

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 (SBT) が疫学的に有用であることを分担

研究報告「*Legionella pneumophila* 臨床分離株の遺伝子型の解析」において記述したが、7 種類の遺伝子型を多数の菌株についてすべて調べるのは労力的にも費用的

にも大変である。そこで、昨年度、SBT 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分離株 (167 株)、および冷却塔水分離株 (128 株) について調べたところ、冷却塔水分離株は、*flaA1* と *flaA11* が多く、浴槽水分離株は、*flaA2, 3, 4, 6, 7, 10, 12* が多く、両者で *flaA* 遺伝子型に明白な違いがあることがわかった。レジオネラ症患者の感染源が浴槽水あるいは冷却塔水であるならば、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¹⁾。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”の 8 割以上が温泉などの入浴施設となっているが、推定感染源の記載があるのは半数以下で、残りは不明である¹⁾。土壌や給湯水からもレジオネラ属菌は分離されており、それらが感染源になっている可能性もある。そこで、今年度は土壌と給湯水から分離された *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

日本各地の土壌から分離された *L. pneumophila*²⁾ のうち 33 株と、主として都内の 5 ヶ所の施設の給湯水から分離された *L. pneumophila* 12 株 (互いに由来施設が異なるか、同じ施設に由来している場合は異なる血清型の株) について、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 (表 1)。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。

C. 研究結果

土壌分離株 33 株、給湯水分離株 12 株の *flaA* 遺伝子型を調べた (表 2)。土壌分離株は *flaA2* が 42%、*flaA5* が 36%、*flaA6* が 12%、*flaA12* が 9%であった。給湯水分離株は *flaA3* が 33%、*flaA6* が 25%、*flaA1* と *flaA2* がそれぞれ 17%、*flaA7* が 8%で、遺伝子型の分布に違いが見られた。昨年度調べた冷却塔水分離株および浴槽水分離株の結果と、本報告書の分担研究報告「*Legionella pneumophila* 臨床分離株の遺伝子型の解析」で調べた臨床分離株の結果も参考のため併せて図 1 に示した。

給湯水分離株は冷却塔水分離株で最も多い *flaA1* が 17%存在するが、それ以外の *flaA* 型は浴槽水分離株で多く見られるものと共通であった。

土壌分離株は *flaA2* や *flaA6* が見られるのは浴槽水分離株や給湯水分離株と共通だが、ほかではほとんど見られない *flaA5* や *flaA12* が多いという特徴があった。

血清群については、給湯水は浴槽水とよく似た分布を示したが、浴槽水分離株では見られない血清群 7 が 1 株あった。土壌分離株は血清群 1 が最も多く、ついで 8 が多かった (表 1)。血清群 8 は他の環境から検出されることはきわめて少ない。

D. 考察

今回調べた土壌分離株と給湯水分離株について、検査株数は少ないものの土壌分離株は 4 種類、給湯水分離株は 5 種類の *flaA* 型に分けられ、全部で 7 種類の *flaA* 型が存在した。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ため、その他のさまざまな感染源となりうる環境についても検査を行い、遺伝子型別を行うことは有用だと考えられる。

以前の調査で、浴槽水分離株と冷却塔水分離株で *flaA* 型の分布が異なっていることを明らかにした。給湯水は、水温は浴槽水と同様比較的高温だが、浴槽水は温泉水等が用いられるために水質が多様なのに対し、給湯水は通常水道水なので、その水質は冷却塔水に近い。そこで、*flaA* 型がどちらに近いかが興味をもたれたが、今回の調査で、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。土壌に存在するレジオネラ属菌の混入により、水環境のレジオネラ属菌汚染がおこると考えられているが、必ずしもそれを補強する結果は得られず、別の汚染源がある可能性も示唆された。あるいは *flaA5* の菌株は土壌から浴槽水等に混入しても定着しにくいのかもかもしれない。

土壌検体の陽性率は平成 13 年度の調査で 6.3% だった²⁾。これは、給湯水のレジオネラ属菌陽性率 7.1% (平成 19 年度、1 月まで)、浴槽水の陽性率 9.6% (平成 18 年度)、冷却塔水の陽性率 26.1% (平成 18 年度) (以上、東京都予防衛生協会の受託検査の結果による) に比べると低い。しかし、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、約 5% が土木工事や畑仕事等、土や塵埃が感染源と推定されている¹⁾。土壌株の 36% を占める *flaA5* の株は EWGLI のデータベースによるとヨーロッパや北アメリカでは臨床から多数検出されているが、日本では臨床株の報告はない。したがって土壌に存在する株がどの程度感染源になっているかは *flaA* の型別からはわからなかった。

図 1 (下) に示したように、臨床分離株で多い *flaA2*、*flaA6* 型の株は浴槽水、給湯水、土壌のいずれからも分離される。次いで多い *flaA1* 型の株は冷却塔水と給湯水から分離される。また、*flaA3* と *flaA7* 型の株は浴槽水と給湯水から分離される。*flaA4*、10 は浴槽水からしか分離されず、

flaA8 は冷却塔水からしか分離されないが、環境からの検出頻度がいずれも低いので、ほかの感染源がある可能性も考えられる。さらに、数は少ないものの環境から同じ型のものが分離されていない臨床分離株もある。また、冷却塔水からしか分離されない *flaA11* は、ヨーロッパや北アメリカでは臨床から分離されているが、我が国では臨床分離例はない。

今後さらに、土壌および給湯水分離株の株数を増やして、遺伝子型の傾向をより明らかにする必要があると考えられる。

E. 結論

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。

F. 参考文献

- 1) 倉 文明、前川純子、遠藤卓郎、常彬、鈴木敦子、市瀬正之. 2007. 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. 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」平成 18 年度 総括・分担研究報告書 pp37-43.

- 2) 古畑勝則、岡部弥穂、堂ヶ崎知格、原 元宣、福山正文. 2002. 土壌からのレジオネラ属菌の分離状況. 防菌防黴 30:555-561.

G. 研究発表

- 1) 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.
- 2) 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.

H. 知的所有権の取得状況

なし。