

添付 1

ディスクを用いたレジオネラの精度管理の実施方法及び回答方法

1 送付したもの

菌株の輸送容器（試料 1（ディスク 5 枚）、試料 2（ディスク 5 枚）計 10 検体分）、GVPC 培地（20 枚）、PBS 試薬（1 袋）

注意：到着後、すぐに菌数検査を行わない場合には、試料 1、2 を凍結保存（ -40°C 以下）してください。

2 実施方法

試料 1 と試料 2 の各ディスク 5 枚について、次の 3 の検査方法にしたがって菌数測定を行ってください。

3 検査方法

貴所で通常行っている検査方法の検水量が、1,000ml の場合について説明します。

準備するもの

検水用滅菌ビン：1000ml まで検水が入る滅菌ビン 10 本

希釈 PBS 溶液：当方から送付した PBS 試薬の全量を滅菌蒸留水 1,000ml に溶解したものを原液とし、必要量をさらに 50 倍希釈したもの。①、⑤、⑥で使用します。

培地：④と⑦の菌数測定を行う際に使用する通常貴所で使用している培地及び当所から送付した GVPC 培地

その他貴所で菌数測定やレジオネラ属菌検査に使用している器材

方法

- ① 滅菌小試験管に当方から送付したディスク 1 枚をピンセット等を使用して入れ希釈 PBS 溶液を 1ml 加える。
- ② ふ卵器（レジオネラ等の培養温度）に入れて 10 分ぐらい保温する。
- ③ ふ卵器から出して 10 秒間ボルテックス等を用い、ディスクが溶解するまで混和する。（完全に溶解していることを確認してください。ただし、細かい炭抹が残ることがあります。）
- ④ その溶液から平板各 2 枚に各 0.1ml を採り、菌数を測定する。（必要に応じて溶液から、さらに 0.1ml を採り段階希釈を行う。）
- ⑤ ③の残りの溶解液すべてを 1000ml の滅菌ビンに入れ、その後約 5ml の希釈 PBS 溶液を加え小試験管内を洗い③の溶液を入れた 1000ml の滅菌ビンに入れる。これを 2 回繰り返す。
- ⑥ その溶液に希釈 PBS 溶液を加えて全量を 1,000ml にする。
- ⑦ 1,000ml とした溶液を検水とし、貴所で通常行っているレジオネラ検査法を行い、菌数を測定する。
- ⑧ あわせて、発育菌の同定を行う（血清型別）。
- ⑨ メールでお送りしたファイルに、貴所の検査方法、④と⑦の両方の菌数測定結果、⑧の同定結果を記入して返送する。

4 注意事項

- (1) 例えば、検水量が 500ml の場合は、⑤⑥⑦の部分の 1,000ml を 500ml、と読み替え、それ以外の検水量の場合もそれぞれ検水量を読み替えて実施してください。
- (2) ④と⑦の菌数測定を行う際には、通常貴所で使用している培地を用いますが、試料 1 の⑦については、当方から送付した GVPC 培地も使い、両方の培地によって菌数を測定してください。(貴所で同じ GVPC 培地を使用している場合も両方の培地を使用してください。)
- (3) ディスク溶解後は、速やかに検査を行ってください。
- (4) お忙しいところ申し訳ありませんが、この結果は平成 19 年 1 月 30 日まで回答をいただけるようお願い致します。

5 問い合わせ先

神奈川県衛生研究所：微生物部、渡辺祐子

Tel : 0467-83-4400、(内線 7017)

Fax : 0467-83-4457

Email : watanabe.nfa0@pref.kanagawa.jp

添付2 回答様式

記入例

④は プレートあたり30個以上300個以下のコロニーがでる状態で記入下さい。
記入例は 検水1000mlとした場合となります。検水量が異なる場合は適宜変更して下さい。

菌数測定結果

地研名	試料1	プレート当り			平均菌数	希釈倍率	希釈倍率を乗じた値	送付したGVPC培地を使用した結果						
		菌数	菌数	平均菌数				平均菌数	希釈倍率	希釈倍率を乗じた値	平均菌数	希釈倍率	希釈倍率を乗じた値	
④の培養菌数	a	200	195	198	(CFU/0.1ml)	1	(CFU/ml)							
	b	255	190	223		201		2008						
	c	199	155	177	SD			SD						
	d	222	255	239		29.900		299.00						
	e	155	180	168										
⑦の培養菌数	a	18	19	19	(CFU/0.1ml)	1	(CFU/100ml)	a		#DIV/Q	(CFU/0.1ml)	1	(CFU/100ml)	
	b	15	13	14		139		139	b		#DIV/Q	#DIV/Q		
	c	8	7	8	SD				c		#DIV/Q	SD		
	d	20	17	19		4.788			d		#DIV/Q	#DIV/Q		
	e	9	13	11					e		#DIV/Q			
回収率														
同定結果	菌種													
	血清型													
試料2	菌数	菌数	平均菌数	平均菌数	希釈倍率	希釈倍率を乗じた値								
④の培養菌数	a			#DIV/Q	(CFU/0.1ml)		(CFU/ml)							
	b			#DIV/Q	#DIV/Q		#DIV/Q							
	c			#DIV/Q	SD		SD							
	d			#DIV/Q	#DIV/Q		#DIV/Q							
	e			#DIV/Q										
⑦の培養菌数	a			#DIV/Q	(CFU/0.1ml)		(CFU/100ml)							
	b			#DIV/Q	#DIV/Q									
	c			#DIV/Q	SD									
	d			#DIV/Q	#DIV/Q									
	e			#DIV/Q										
回収率														
同定結果	菌種													
	血清型													

例 回収率の計算式
この計算式は検水1000mlの場合です。
検水量により変更して下さい。

$$\frac{\text{⑦の菌数(CFU/100ml)} \times 10 \div 0.7}{\text{④の菌数(CFU/ml)}} \times 100 =$$

$$\frac{139 \times 10 \div 0.7}{2008} \times 100 = 98.9\%$$

写真1 標準試料の梱包



図1 送付した試料の溶解方法

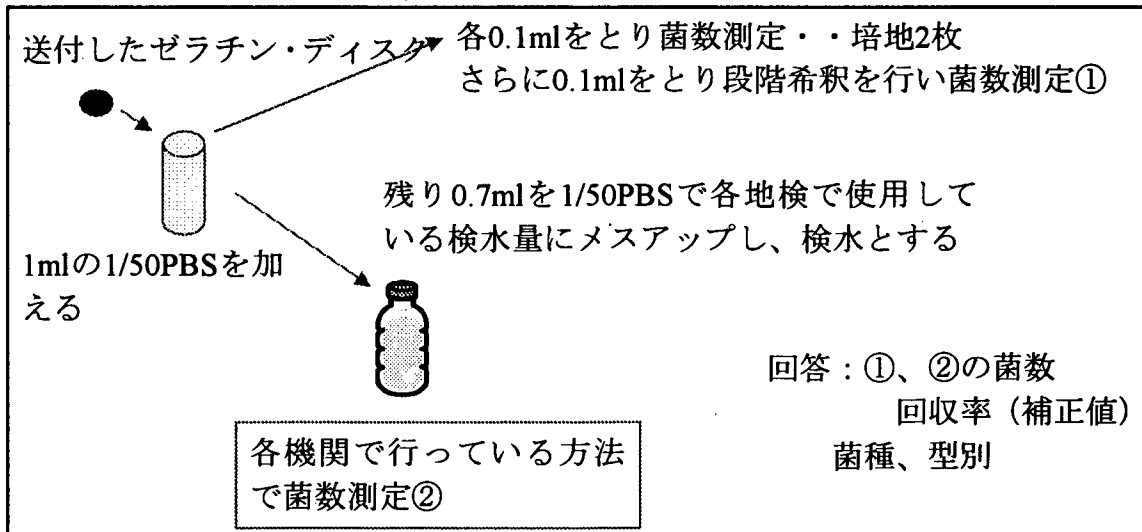


表1 標準試料の菌数

検査場所	検査日	試料1			試料2		
		n	平均試料菌数*	CV%	n	平均試料菌数	CV%
感染研	07.10.09	3	2.5×10^3	7.1	3	5.8×10^5	13.3
神奈川	07.09.20	3	3.9×10^3	25.6	3	6.0×10^5	25.9
神奈川	08.01.05	1	4.9×10^3		1	7.9×10^5	
平均菌数			3.7×10^3			6.6×10^5	

* :CFU/ml

表2 溶解・保存条件によるディスクの生残性

	溶解・保存条件	平均菌数*	CV%
試料3a	37°C5分溶解	1.1×10^5	33.6
試料3b	室温5分溶解	1.9×10^5	41.7
試料3c	4°C1日保存	0.6×10^5	12.7
試料3d	-80°C7日保存	2.0×10^5	36.0
試料3e	4°C7日保存	1.2×10^5	7.4

* :CFU/ml、n=3

表3 ゆうパック輸送によるディスクの生残性への影響

	発送前 平均菌数*	CV%	到着後 平均菌数*	CV%	発送前後の 回収率(%)
試料4	1.8×10^2	43	3.8×10^2	40	210.1
試料5	1.6×10^3	47	0.9×10^3	3	56.3
試料6	4.2×10^3	61	3.9×10^3	26	92.8

* :CFU/ml、n=3

表4 標準試料の菌数と検水からのレジオネラ属菌検査結果

* :CFU/ml、n=5

表4 標準試料の菌数と検水からのレジオネラ属菌検査結果

機関	試料1			試料2		
	ディスク菌数CFU/ml	検水の菌数CFU/ml	回収率%	ディスク菌数CFU/ml	検水の菌数CFU/ml	回収率%
A	2,430	0	0	283,600	22,357	7.9
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
	2,755	0	0	226,800	13,179	5.8
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	1,700	0	0	284,000	16,786	5.9
B	2,520	0	0	188,800	12,250	6.5
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
	17.4	0.0	0.0	193,200	10,179	5.3
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	2,685	0	0	235,000	22,917	9.8
C	18,200	0	0	446,000	74,583	16.7
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
	6,750	0	0	460,000	97,917	21.3
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	15,000	0.5	0	590,000	58,333	9.9
D	11,800	0	0	322,000	51,250	15.9
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
	47.0	0.0	0.0	510,000	66,429	13.0
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	5,500	0	0	660,000	36,214	5.5
E	5,550	0	0	650,000	130,714	20.1
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
	4,820	0	0	520,000	57,857	11.1
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	4,250	0	0	650,000	130,714	20.1
A	690	0	0	85,000	17,200	20.2
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
	34.1	0.0	0.0	307,500	45,986	15.0
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	2,450	0	0	328,500	114,643	34.9
B	125	0	0	366,500	45,714	12.5
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
	101	1	0	418,000	65,714	15.7
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	135	0	0	530,000	135,714	25.6
C	115	0	0	409,000	86,429	21.1
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
	65	0	0	328,500	114,643	34.9
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	65	0	0	366,500	45,714	12.5
D	65	0	0	418,000	65,714	15.7
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
	33.3	0.0	0.0	530,000	135,714	25.6
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	65	0	0	409,000	86,429	21.1
E	9,900	1	0	328,500	114,643	34.9
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
	6,350	0	0	366,500	45,714	12.5
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	4,850	0	0	418,000	65,714	15.7
A	7,750	0	0	530,000	135,714	25.6
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
	39.6	0.0	0.0	409,000	86,429	21.1
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	5,750	0	0	328,500	114,643	34.9
B	3,500	0	0	366,500	45,714	12.5
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
	6,350	0	0	418,000	65,714	15.7
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	4,850	0	0	530,000	135,714	25.6
C	7,750	0	0	409,000	86,429	21.1
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
	39.6	0.0	0.0	328,500	114,643	34.9
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	5,750	0	0	366,500	45,714	12.5
D	3,500	0	0	418,000	65,714	15.7
	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
	6,350	0	0	530,000	135,714	25.6
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
	4,850	0	0	409,000	86,429	21.1

表5 各機関のレジオネラ属菌検査方法

1:機関名	A	B	C	D	E	F	G
3:検査開始までの保存方法	-40℃	-40℃	-80℃		-80℃	-80℃	-40℃
5:検査日	2日	1日	3日	当日	2日	7日	4日
6:検水量(ml)	500ml	500ml	1000 ml	200ml	500ml	500ml	1000ml
7:濃縮法	ろ過法	ろ過法	冷却遠心法	冷却遠心法	ろ過法	ろ過法	通常ろ過法
a:ろ過法							
フィルターの素材	ポリカーボネート	CELLULOSE ACETATE			ポリカーボネート	3(PVDF)	ポリカーボネート
フィルターポアサイズ	0.4μm	0.2μm			0.2μm	0.4μm	0.2μm
フィルターのメーカー	ミリポア	ADVANTEC			ミリポア	ミリポア	アドバンテック
b.冷却遠心法							
回転数			9000rpm g	6000rpm 5960g			
遠心時間			40分	30分			
上清の除去方法			デカンテーション	ピペット			
8:濃縮倍率	100倍	100倍	100倍	200倍	100倍	100倍	100倍
9:再浮遊量	5mL	5mL	4mL	1mL	5ml	5mL	10mL
10:雑菌処理法	加熱処理	加熱処理	加熱処理	酸処理	加熱処理	加熱処理	通常a,b.未処理.場合によってはcも併用
a:加熱処理							
加熱時間	20分	20分	20分		20分	20分	20分
加熱温度	50℃	50℃	50℃		50℃	50℃	50℃
b:酸処理							
酸処理時間				4分			4分
c:加熱、酸処理併用							
加熱処理温度							50℃
加熱処理時間							20分
酸処理時間							4分
11:培地(④の菌数カウント)	GVPC	GVPCとWYOα	GVPC	MWY	GVPC	GVPC	BCYEα及びMWY
12:培地(⑦の菌数カウント)	GVPC	WYOα、GVPC、	GVPC	MWY	GVPC	GVPC	BCYEα及びMWY
13:培地(⑦の菌数カウント)1検体当たり)	2枚	各10枚	4枚	2枚	4枚	2枚	
14:最終培養日数		7日	10日		6日	5日	通常10日
15:使用キット名	レジオネラ免疫血清「生研」	レジオネラ免疫血清「生研」	レジオネラ免疫血清「生研」 Oxoid レジオネラ・ラテックス	レジオネラ免疫血清「生研」	レジオネラ免疫血清「生研」 Oxoid レジオネラ・ラテックス		レジオネラ免疫血清「生研」 Oxoid レジオネラ・ラテックス 不明の場合は極東DDHやシーケンスも
16:レジオネラ属菌検査経験年数	7年		1年		2年		15,3,1年

特記事項、ご意見等

- ・検水のろ過に2時間を要した。ゼラチンディスクの使用の是非についてご検討をお願いしたい
ろ過の困難な検体の処理法について、検討する必要があると感じた。
- ・当所では基本的に濃縮検体を×1と×10のみの検査を実施している。
- ・今回の No.2 のような菌量の試験品で検査する場合には、再検査するだけの日数が必要。
この調査には3名で対応した。多忙のおり厳しい量だとおもった。
- ・内部精度管理を実施しなければならないことが明らかになった。
- ・実施要領について、もう少しわかり易い、フローチャート形式の添付があればよかった。

- ・ろ過吸引後、炭沫が吸引ガラスに付着しているようでした。ろ過終了後に、洗い込み操作の注意書きの必要がありそうです。
- ・無菌的に大量の希釈液を作成するには抵抗がありました。溶解後滅菌としたほうが良いのではないのでしょうか？
- ・以前からろ過法として CELLULOSE ACETATE では良くないと聞いてはいましたが、今までの検査への整合性と県内の民間検査機関が CELLULOSE ACETATE を使用している関係上、あえて実施してみました。多くの民間検査機関がろ過濃縮処理法を採用している中、ろ紙の問題、処理前の菌数測定など提言できることが多くあると思いました。
- ・事前にフローサイトメトリーでスクリーニングして細胞粒子数を評価し、粒子数が多い場合やろ過時の状態から高汚染を予想できる場合には酸処理4分を追加
- ・雑菌処理法のcはそれぞれ単独による併用でしょうか？加熱後酸処理を行うとういことでしょうか？使用培地数は通常、原液及び濃縮液に BCYE α 、MWY を各3枚ずつ使用。結果1検体につき BCYE α 6枚、MWY 6枚使用。

平成 19 年度分担研究報告書

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

分担研究者 山崎 利雄 国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室

(ハンセン病研究センター病原微生物部・細菌第一部)

前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部

研究概要

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、今年度は、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た。

A. 研究目的

レジオネラ症は、レジオネラ属の細菌によって引き起こされる感染症である。レジオネラ属菌は、自然界に広く分布している。特に、土壌や沼地や、冷却塔、室内加湿器、給湯設備、循環式浴槽や、温泉などに普通に存在する環境細菌である。レジオネラは、アメーバの中で増殖する。現在約 50 種のレジオネラ属菌が報告されているが、既存の DDH キット(極東製薬工業)では 25 種しか同定できない。浴槽水から *Legionella Londiniensis*、*L. nautarum* 等が検出されているが、キットにはない。代用する 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定では、登録されているレジオネラ属菌の塩基配列と一致しないことも多く、同定できる感度は低い。その為、既存のキットにないレジオネラ属菌種を、同定可能な DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) プレートを試作する事を目的とする。今年度は、既同定済みのレジオネラ属菌株を用いて、文献を参考にして DDH 法用プレートの基準株 DNA のプレートへの固定方法について検討した。

B. 研究材料と研究方法

1) 使用菌：今年度は、DDH 法用プレー

トの作製を目標としたので、*E. coli* を対照菌として、従来法にて同定した当研究所保存 *L. pneumophila*、*L. feeleii*、*L. micdadei* を用いた。

2) DNA の準備：BCYE α 培地にて 35°C で 4 日間培養したレジオネラ属菌を、リゾチーム-SDS にて抽出して得られた粗 DNA 溶液を、フェノールクロロホルム処理後、エタノールを加えて DNA を析出させ、ガラス棒にて巻き取り、再溶解させた DNA を RNase 処理後、フェノールクロロホルムにて再精製後、エタノール沈殿を行った。DNA を TE-緩衝液に再溶解させ、DNA 量と純度を測り、各種濃度に調整した DNA 溶液を DDH 法用プレート作製に供した。

3) DDH 法：被検菌より DNA を抽出・精製した DNA に標識試薬を 100 μ l 加え、500W の水銀灯下で 10 分間 DNA の標識を行った。アルカリ法により一本鎖化後、ハイブリダイゼーション試薬を加えてから、基準株を固定させたプレートに 100 μ l ずつ分注し、50°C で 1 時間 30 分間ハイブリダイゼーションを行った。1XSSC で 3 回洗浄後、発色酵素 100 μ l を加え、37°C 10 分間放置した。その後、1XSSC で 3 回洗浄、発色基質 100 μ l を添加し、

発色を吸光度測定（波長 630nm）または写真撮影を行った。試薬類は、既存の DDH レジオネラキット（極東製薬工業）内の物を用いた。

4) 判定：発色後 5～10 分以内に ELISA プレートリーダー(BIO-RAD 社)を用いて 630nm の吸光度を測定した。最も強く反応したウエルの吸光度(Max. Abs.)が対照ウエルの吸光度(Blank Abs)の 1.9 倍以上でかつ、2 番目に高い吸光度(2nd.Abs.)を示したウエルの相対類似度が 70%以下の時の結果を採用し、この基準に達しないものは判定不可とした。相対類似度 (%) は (2nd.Abs.-Blank abs./ Max. Abs.-Blank Abs.) × 100 として計算した。

C. 研究結果

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 5μg/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 μl ずつマイクロプレート(Nunc 468667)に分注し、30℃で 1 晩放置し、固定させた。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 μl 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った。溶液を破棄後、50℃で 2 時間プレートを乾燥させた。プレートを遮光性の袋に入れ、乾燥剤をいれて保存した。*L. pneumophila*、*L. feeleii*、*L. micdadei* の各菌を基準株として、DDH を行った結果を、表 1 と図 1 に示した。*L. pneumophila*、*L. feeleii* は、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。また、肉眼でもはっきりと鑑別することができた。このことより、前記プレート作製方法は、既存のキットに無いレジオネラ属菌の同定を可能にするようになった。

D. 考察

レジオネラ属菌用 DDH 法プレート作製は、参考文献を参考に試行錯誤を繰り返

返し、結果に示した様に DNA の方法を確立した。しかし、結果に示した表 1 と図 1 で、*E. coli* と *L. micdadei* の発色が悪かった。*E. coli* は、DNA の純度が悪く、5μg/ml の濃度ではなかった。また、*L. micdadei* は、被験菌株の DNA 量が少なすぎたため、発色しなかったものと考えられた。再度 DNA を取り直して、再実験して確認する予定である。

レジオネラ属は大きさ 0.3 から 0.7×2～5 μm でグラム陰性の中央がやや膨らんだ短桿菌である。ほとんどの菌種が極鞭毛を持ち、絨毛を有するが、莢膜及び芽胞はもたない。増殖には、L-システインとピロリン酸鉄あるいは硝酸鉄、α-ケトグルタル酸を加えた buffered charcoal yeast extract(BCYE α)寒天培地を用いて培養する。臨床検体や、環境由来の水などのサンプルには、BCYE α 培地に選択剤を加えて培養すると、36℃で 3～7 日間で灰白色、光輝性、凸状、正円のコロニーが形成される。生化学的性状では、糖の酸化、醗酵もせずアミノ酸を炭素源として利用するが、生化学検査法で陽性となる項目が少ないため、菌種名の同定が難しい。そのため、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分類が行われているが、標準菌種の塩基配列と完全に一致しない事も多く、作業が煩雑であるため、一般の検査室での同定は難しい。そのため、DDH 法のキットが市販されているが、25 菌種しか同定できないので、沢山の菌種を簡単に同定する標準的な方法として、一般の検査室でも利用できるように、本研究を開始した。本年度は、基準株の DNA のプレートへの固定方法を確立したので、既存キットにない *L. londiniensis*、*L. nautarum* を固着させ、検出可能か検討する予定である。また、相対類似度の測定も行う予定である。さらに、自作したプレートを研究班員に配り、分離されたレジオネラ属菌に使ってもらい、その信頼性を確かめることも今後の課題として残っている。

E. 結論

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の検討により、基準株 DNA 固定プレートを作製することができるようになった。この事により、

既存の DDH キット(極東製薬工業)では同定できない *Legionella londiniensis*, *L. nautarum* も DDH 法により同定する事が可能となった。

F. 参考文献

- 1) Kusunoki, S., Ezaki, T., Tamesada, M., Hatanaka, Y., Asano, K., Hashimoto, Y., and E. Yabuuchi. 1991. Application of colorimetric microdilution plate Hybridization for Rapid Genetic Identification of 22 Mycobacterium Species. *J. Clin. Microbiol.* 29:1596-1603.
- 2) Ezaki, T., Y. Hashimoto, N., Takeuchi, H., Yamamoto, S.-L., Liu, H., Miura, K., Matsui, and E. Yabuuchi. 1988. Simple genetic method to identify viridans group streptococci by colorimetric dot hybridization and fluorometric hybridization in microdilution wells. *J. Clin. Microbiol.* 26:1708-1713.
- 3) Ezaki, T., Y. Hashimoto, and E. Yabuuchi. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic

relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:224-229.

- 4) Ezaki, T., Y. Hashimoto, H. Yamamoto, M. L. Lucida, S.-L. Liu, S. Kusunoki, K. Asano, and E. Yabuuchi. 1990. Evaluation of the microplate hybridization method for rapid identification of *Legionella* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9:213-217.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 前川純子、森本洋、熊田裕子、藤田雅弘、黒木俊郎、杉山寛治、緒方喜久代、縣邦雄、山崎利雄、渡辺治雄、倉文明、掛け流し式温泉成分検査、微生物実態調査、および施設の衛生管理状況についての調査、第 81 回日本細菌学会総会、2007、3 月、京都

G. 知的所有権の取得状況

なし

表1 レジオネラ属同定用作成プレートを用いたDDH法による吸光度の測定

固定菌種名	吸光度測定値			
	<i>E. coli</i>		<i>L. pneumophila</i>	
	5分後	10分後	5分後	10分後
<i>E. coli</i>	0.053	0.075	0.070	0.124
<i>L. pneumophila</i>	0.052	0.073	0.199	0.450
<i>L. feeleii</i>	0.058	0.076	0.094	0.164
<i>L. micdadei</i>	0.053	0.074	0.096	0.170

固定菌種名	吸光度測定値			
	<i>L. feeleii</i>		<i>L. micdadei</i>	
	5分後	10分後	5分後	10分後
<i>E. coli</i>	0.086	0.149	0.057	0.084
<i>L. pneumophila</i>	0.093	0.160	0.052	0.080
<i>L. feeleii</i>	0.846	1.509	0.057	0.082
<i>L. micdadei</i>	0.109	0.201	0.064	0.091

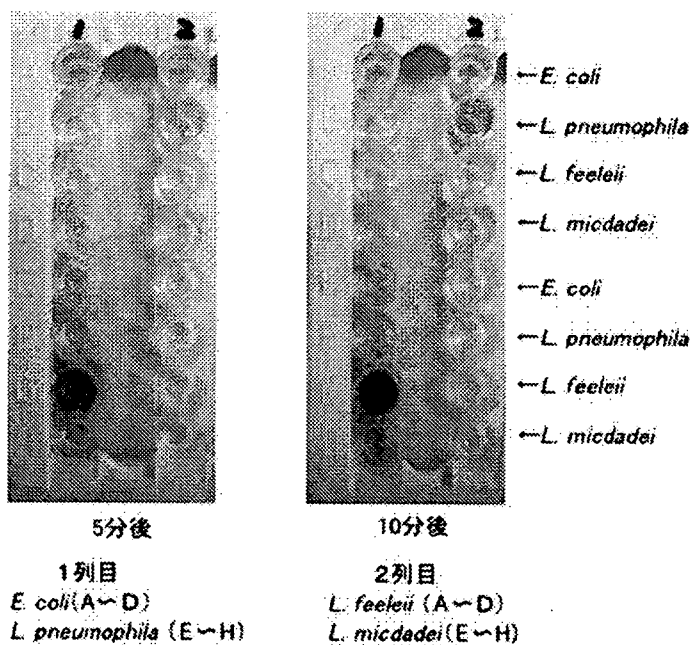


図1 レジオネラ属同定用作成プレートを用いたDDH法による同定結果

「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」

アメーバ等によるレジオネラ属菌の病原性評価

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 八木田健司 国立感染症研究所 寄生動物部

概 要

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)。血清型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、より実際的な活用が期待される。

A. 研究目的

レジオネラの病原性に関する *in vitro* の試験法としては、これまでアメーバを用いる方法、またヒト由来のマクロファージ等の細胞を用いた方法があり、菌の病原性はアメーバ/細胞の共培養(co-culture)によって得られる菌の(細胞内)増殖量の時間的変動(kinetics)により評価される。そして、一定時間後における増殖度を log 表示することで定量化が図られている。このような方法により *Acanthamoeba* を用いた実験で *L.*

pneumophila が他菌種よりも強い病原性を示すこと(Moffat and Tompkins 1992、Gaoら1999、Neumeisterら1997)、また同一の血清型(SG)でも感染性に差があり、SG1 臨床株でもアメーバ感染しないものがあること(Molmeret ら2001)などが報告されている。他に同様な成績が別のアメーバである *Hartmannella vermiformis* を宿主とした実験でも報告されている(Wadowskyら1991)。この kinetics を利用した方法は比較的簡便に菌の増殖性を知ることができる

が、本来知るべき感染時における菌の感染能力が不明のまま評価が行われる点が問題点として残されている。

我々は「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 - 厚生労働科学研究費補助金（平成 18 年度、地域健康危機管理研究事業）」（八木田ら、2006）において、レジオネラのアメーバに対する感染性を定量化する新たな方法として ID50 (50%infectious dose) を尺度とするマイクロプレートアッセイ法を開発した。本法は感染時における菌の病原性（感染と細胞内増殖のサイクルを繰り返すこと）を直接的にとらえる方法で、その解析結果は良好な定量性を示す。レジオネラの病原性を ID50 で評価した研究はこれまでになく、本年度は様々なレジオネラの菌種、血清型の ID50 を調べ、レジオネラの病原性評価を行ない、その有用性を検討した。

B. 研究方法

1. 宿主アメーバ:

試験には *Acanthamoeba* sp. 76-2253 株を用いた。75cm² 培養フラスコ (SMILON 製) を用いて 10ml の PY 培地で 30℃、3 日間培養し、単層に増殖したものを用いた。

2. レジオネラ属菌:

異なる菌種あるいは同一菌種内での異なる血清型の比較を行なうために、表・1 にある菌株を用いた。*L. pneumophila* に関しては、80-045 株ならびに NIIB 374 株 (SG1、臨床分離株)、985 株ならびに 998 株 (SG1、冷却塔分離株)、NIIB 378 株 (SG1、浴槽水分離株)、#2427 株 (SG6、浴槽水分離株)、#2428 株、#2429 株ならびに #2430 株 (以上 SG8、浴槽水分離株) を用いた。また *L. dumoffii* に関しては、#2431 株ならびに

#2432 株 (以上浴槽水分離株)、*L. longbeachae* は NIIB 56 株 (臨床分離株) を、*L. londiniensis* は NIIB 385 株 (浴槽水分離株) を、そして *L. bozemanii* は WIGA 株 (臨床分離株) を用いた。なお、*L. pneumophila* NIIB374、NIIB378、#2428、ならびに #2429、*L. dumoffii* #2431 ならびに #2432 そして *L. londiniensis* NIIB 385 の各株は 2002 年、宮崎県の温泉施設で発生したレジオネラ集団感染事例 (岡田ら 2005) の際に臨床ならびに環境試料より分離されたものである。いずれの菌株も -80℃ 凍結保存試料を BCYE α 培地 (DIFCO 製、#218301) に接種後 3 日間、30℃ で培養したものを用いた。試験に際しては、アメーバ用生理食塩水 (AS) を用いて必要濃度に調整した。

3. アメーバ用生理食塩水 (Amoeba saline: AS) の調整:

Page の処方 (Page, 1967) に基づき、A 液 (NaCl 12.0g/100ml、MgSO₄ · 7H₂O 0.4g/100ml、CaCl₂ · 2H₂O 0.4g/100ml)、および B 液 (Na₂PO₄ 14.2g/100ml、KH₂PO₄ 13.6g/100ml) を作製した。試験に際して A および B 両液を混合して 10 倍あるいは 100 倍に蒸留水により希釈して用いた。10xAS (10 倍希釈 AS) は A および B の元液を直接混合すると沈殿が生ずるため、A 液を先に蒸留水で 5 倍程度に希釈した後に B 液を加え、さらに蒸留水を加えて最終的に両液が 10 倍希釈になるように調整した。調整後の 10xAS はフィルターろ過滅菌して保存した。オートクレーブ処理は沈殿を生ずるため滅菌には不適であった。1xAS (100 倍希釈 AS) は 10xAS をさらに蒸留水で 10 倍希釈することで調整し、同様にろ過滅菌して用いた。

4. レジオネラ試験液の調整:

BCYE α 培地で培養した菌はループで回収し 4ml の 10xAS に入れ懸濁液を作製し、その 2.5ml を等量の 10%ホルマリン溶液と混合したのち、吸光度 (660nm フィルターの O.D.値) から濃度を測定した。得られた O.D.の 2 倍を元液の O.D.とし、これより 1.0 O.D.の菌液を 10xAS で調整した。感染試験には、10xAS を用いて 1.0 O.D.の菌液の 2 倍希釈系列を作成して用いた。

5. マイクロプレートアッセイ法の手順:

これまでに考案した ID50 解析のためのマイクロプレートアッセイ法を用いた。手順は概ね前年度と同様であるが、菌株により 1.0 O.D.の 10^{-6} あるいは 10^{-7} 希釈したものを試験用の希釈系列を調整する原液として用いた。原液の 0.1ml を BCYE α 培地 5 枚に接種し、35°C で 4-5 日間培養後、菌数を測定し、 10^{-6} あるいは 10^{-7} 希釈した試験用原液の平均菌濃度を求めた。各希釈系列の試験液の菌濃度は、この原液の平均菌濃度に希釈倍数 (1/2、1/4...) を乗じて算出した。

6. 50% Infectious dose (ID50) の算出:

算出された各菌濃度における培養陽性率をその濃度における菌の感染率と考え、菌濃度と感染率の関係をプロビット法を用いて解析し、50%感染濃度 (10 ウェル中 5 ウェルにおいて培養陽性となる菌濃度) を算出した。

7. レジオネラのアメーバ細胞内増殖の観察

アメーバ感染後のレジオネラの細胞内増殖を観察するために、菌感染アメーバを以下の方法で調整し、ギムザ染色標本作製した。また顕微鏡観察により、任意に 1,000

アメーバ細胞を観察し、その中のレジオネラ感染アメーバ数の割合を算出した。なお、感染アメーバの定義は、細胞内で 2 分裂以上したレジオネラの確認されたアメーバとした。さらにレジオネラの株による細胞内増殖の進行度合いを調べるために、細胞内で形成された菌増殖のクラスターの形態的比較を行った。

レジオネラ感染アメーバ作製手順:

- 1) *Acanthamoeba* 76-2253 株を PYGC 培地で 75ml 培養フラスコにてほぼ単層に増殖させる。
- 2) 培地を除去後、5ml の 1xAS で洗浄し、その洗浄液を除去後、新しい 1xAS あるいは 10xAS を 2ml 加える。
- 3) レジオネラは滅菌蒸留水で浮遊液を作成し、0.1OD に濃度を調整する。
- 4) 上記調整レジオネラ浮遊液 0.2ml をアメーバの付着するフラスコに加え、軽く混和し 24 時間、35°C にて感染させる。
- 5) フラスコを氷水上にのせ、アメーバを剥離させ、浮遊液を遠心管に移す。
- 6) 500xg、5 分間遠心。上清を除去する。
- 7) 5ml の 10xAS で再浮遊し、500xg、5 分間遠心。上清を除去する。
- 8) 上清を 0.2ml ほど残して、その中で沈渣のアメーバを再浮遊する。
- 9) 安全キャビネット内でスライドグラス上にアメーバ浮遊液を塗布し、自然乾燥させる。
- 10) メタノールで 3 分間固定し自然乾燥後、ギムザ染色を室温にて 30 分間行なう。
- 11) アメーバ内のレジオネラが容易に確認できるまで適宜水道水で洗浄し、自然乾燥させる。倍率 \times 1000 で標本を観察する。

C. 結果

1. レジオネラ菌株の ID50 の比較

調べた菌株の ID50 を菌種および血清型ごとにまとめた結果を表-2 に示した。

L. pneumophila は SG1 が 5 株、SG6 が 1 株および SG8 が 3 株調べられた。いずれの菌株も・80℃保存試料の BCYE 培地上での発育は良好で、1.0 O.D. の 10^{-7} 希釈液の平均菌数 (cfu/0.1ml) が 60~90 であったことから、 10^{-7} 希釈液を試験用原液として用いた。各 SG の ID50 (cfu/0.1ml) は SG1 の場合で 1.8~4.4、SG6 の場合で 2.2、また SG8 の場合で 1.1~3.8 となり、同一血清型でも株による差があることが示唆された。分離株の由来と ID50 の関係をみると、ヒト分離株の場合、80-045 株が 2.5、NIIB374 株が 1.8 を示し、比較的高い病原性が示された。環境分離株に関しては、998 株 (SG1)、NIIB378 株 (SG1) また #2428 株 (SG8) がヒト分離株よりも低い病原性を示す一方で、985 株 (SG1)、#2429 株ならびに #2430 株 (いずれも SG8) のようにヒト分離株と同程度の病原性を示すものが存在することが明らかにされた。特に、#2429 株および #2430 株は集団感染事例のあった浴槽水由来の菌株で、これらがヒト分離株と同等の病原性をもっていたことは注目される所見であった。

L. dumoffii #2431 株および #2432 株に関する・80℃保存試料の 30℃培養 (3 日間) の増殖性は *L. pneumophila* と同等と観察されたが、3 日間培養株を希釈した際のコロニー形成率がやや低く、1.0 O.D. の 10^{-7} 希釈液の平均菌数 (cfu/0.1ml) が 20~30 であった。 10^{-7} 希釈液を試験用原液として用い ID50 を調べた結果、#2431 株が 5.4 また #2432 株が 3.2 であった。両株はいずれも

集団感染事例のあった浴槽水由来であったが、同じ事例で浴槽水より分離された *L. pneumophila* (SG8) の株よりも病原性が低いことが示唆された。

L. longbeachae NIIB56 株の・80℃保存試料の 30℃培養 (3 日間) の増殖性は *L. pneumophila* と同等と観察されたが、3 日間培養株を希釈した際のコロニー形成率は *L. dumoffii* と同様に低く、1.0 O.D. の 10^{-7} 希釈液の平均菌数 (cfu/0.1ml) が約 26 であった。 10^{-7} 希釈液を試験用原液として用い NIIB56 株の ID50 を調べた結果、ID50 は 4.3 であった。本株はヒト剖検肺由来の標準分離株として知られるが、*L. pneumophila* ヒト分離株よりも病原性が低いことが示された。

L. bozemanii WIGA 株の BCYE 培地上での発育性は上記 3 菌種よりもさらに低く、・80℃保存試料の 30℃培養 (3 日間) の増殖性は *L. pneumophila* とほぼ同等と観察されたが、3 日間培養株の 1.0 O.D. の 10^{-6} 希釈液の平均菌数 (cfu/0.1ml) が約 23 であった。 10^{-6} 希釈液を試験用原液として用い WIGA 株の ID50 を調べた結果、ID50 は 7.7 であり、これは今回調べたヒト分離株の中では最も高い ID50 であった。本株もヒト剖検肺由来の標準分離株であるが、*L. pneumophila* ヒト分離株よりも病原性が低いことが示された。なお *L. bozemanii* WIGA 株の試験において、*L. pneumophila*、*L. dumoffii* ならびに *L. longbeachae* の試験ではマイクロプレートウェル内試料の培養確認試験の結果として、感染のためにウェル内に加えられた菌数が数 cfu の場合であってもウェル内試料を塗布した全面に無数のコロニーが生じるのに対し、*L. bozemanii* WIGA 株の場合は、数コロニーしか検出されない場合が見られ

た。培養試験で数コロニーであってもウェル内の総菌数としては感染時より多くなっていれば細胞内増殖が生じたと考えられるので陽性に変わりはないが、低コロニーの検出という結果は *L. bozemanii* WIGA 株の細胞内増殖が、他の菌株と比較して進行が遅いことを示し、結果判定には慎重を期すべきものと考えられた。

L. londiniensis NIIB385 株の -80°C 保存試料の 30°C 培養 (3 日間)における発育は遅く、*L. pneumophila*の3日間培養の状態に達するには倍の6日間を要した。6日間培養株を希釈した際のコロニー形成率は低く、1.0 O.D.の 10^{-7} 希釈液の平均菌数 (cfu/0.1ml)で約13であった。コロニー形成率が低かった他の菌種でも 10^{-7} 希釈液を試験用原液として ID50 を調べることが可能であったことから、本分離株に関しても同様の条件で試験したところ、菌感染の最高濃度である 7.2cfu/0.1ml でも感染率は 0%であった。そこで新たに 10 倍希釈系列を作製し、 10^{-4} から 10^{-7} までの4段階で試験した結果、最高濃度の 10^{-4} 希釈でも感染率は同様に 0%であった。このときの ID50 は $>1.2 \times 10^4$ と算出された。集団感染事例のあった浴槽水より分離された *L. pneumophila* あるいは *L. dumoffii* の ID50 が 1.1~5.4 であるのと比較して、同様に分離された *L. londiniensis* NIIB385 株に関しては、著しい病原性の低さが示された。

2. 菌感染アメーバ内におけるレジオネラ分離株の増殖の観察と比較

ID50 試験において、分離株による病原性の差が大きいことが示されたことから、直接的にアメーバ内に増殖するレジオネラ株の増殖性を顕微鏡的に比較し、その要因を調べた。

試験では確実に感染し細胞内増殖する *L. pneumophila* 80-045 株を陽性対象として用い、低 ID50 を示した *L. bozemanii* WIGA 株ならびに病原性が極めて低いと推定された *L. londiniensis* NIIB385 株の2株を調べた。感染アメーバの割合を比較した結果を図-1 に示した。*L. pneumophila* 80-045 株の場合は 10xAS 条件では、すでに大半のアメーバが感染後破壊された状態であったが、残存した細胞を調べた結果その感染率は 76.6%であった。1xAS では残存する細胞がまだ多数みられたが、感染率は 75.4%と 10xAS とほぼ差がなかった。これに対し *L. bozemanii* WIGA 株では感染による細胞崩壊はほとんどみられず、栄養体が多数残存した。1xAS 中での感染率は約 11.0%、10xAS 中では約 31.1%であった。さらに *L. londiniensis* NIIB385 株に関しては、*L. bozemanii* と同様に細胞崩壊はみられず、また極めて高濃度の菌との共培養条件でありながら、アメーバの菌感染率は 1xAS ならびに 10xAS の条件でともに 0%であった。

アメーバ内における菌増殖のクラスター形成を図-2 に示した。同一菌株でもアメーバ細胞によりクラスターの形態、大きさに差は見られるが、*L. pneumophila* 80-045 株では、細胞内に充満するほどに増殖の進行した例が多数観察され、標本上でアメーバより菌が放出されている像も見られた。これに対し、*L. bozemanii* WIGA 株では観察されるクラスターが小さく、明らかに *L. pneumophila* 80-045 株に比べ細胞内増殖の速度が遅く、それによりアメーバあたりの菌量も少なくなっていることが明らかとなった。なお、AS の濃度によるクラスターの大きさには差は見られなかった。

3. 宮崎集団発生事例におけるレジオネラ調査データと同事例分離株の ID50 との関係

宮崎集団発生事例において感染源と考えられた浴槽施設から本研究で試験した分離株が得られているが、当該事例の環境調査において報告されたレジオネラ調査データ(岡田ら 2005)と本研究で得られた分離株の ID50 の成績との関係を調べた。

表・3 にその結果を示すが、調査報告では、浴槽水中からは *L. pneumophila* SG1、*L. dumoffii* ならびに *L. londiniensis* が主に検出され、それらの最高濃度はそれぞれ 1.6×10^5 、 5.2×10^5 ならびに 1.5×10^6 cfu/100ml とされている。加えて *L. pneumophila* SG8 および SG6 の検出も確認されている。患者の病原検索結果から、主たる起因菌は *L. pneumophila* SG1 であり、また *L. dumoffii* の感染も生じたこと、一方 *L. londiniensis* は抗体価上昇が見られなかったことから、集団感染への関与は低いと考えられている。本研究における ID50 の成績との関係をみると、主たる起因菌となった *L. pneumophila* SG1 は最も強い病原性を示したのに対し、集団感染への関与が低いと考えられた *L. londiniensis* の病原性はほとんど認められなかった。*L. dumoffii* はその中間的な存在に位置した。なお ID50 の成績では *L. pneumophila* SG6 ならびに SG8 も SG1 と同程度の病原性を有する可能性が示されたが、感染者の抗体検査がこれらの SG に関して行われていないことから、集団感染における SG6 ならびに SG8 の位置づけは不明である。

D. 考 察

アメーバに対するレジオネラの病原性は直接的にヒトへの病原性を評価するものとはならないが、感染源におけるレジオネラ汚染

の成立要因として重要であり、またアメーバ内増殖菌にはヒトマクロファージ感染能力があり、それは BCYE α 培地増殖菌よりも向上していることが明らかにされていることから、レジオネラ感染の微生物学的要因を理解する上で重要な視点と考えられる。ID50 という指標は、レジオネラ感染時における菌の病原性を直接的かつ定量的に解析できる方法である。本年度はこの ID50 により様々なレジオネラの菌種、血清型の ID50 を調べ、レジオネラの病原性評価を行なった。菌種間の比較では、最もヒトへの健康影響が大きく、また SG1 を始め多くの血清型がヒト感染に関与していることが判明している *L. pneumophila* が、従来の報告と同様、*L. dumoffii*、*L. bozemanii* および *L. longbeachae* 等、ヒト感染例が知られる他菌種よりも病原性が高い傾向が認められた。特に *L. pneumophila* の病原性に関しては、ヒト分離株が高く、また SG1 と同等の強い病原性を保持する血清型が環境中に存在することが注意すべき点として挙げられる。レジオネラ感染は、冷却塔、温泉・浴用施設、給湯水また土壌など感染源となる場所は多様で、感染防止対策上そこでの菌種や血清型の病原性を知ることは極めて重要である。この点に関して、ID50 によるレジオネラ菌株の病原性解析は有用な手法であると考えられる。さらに試料を増やし、血清型や分離源と ID50 との関連性を明らかにすることが必要である。

レジオネラには菌株によりアメーバ細胞内増殖性に差が見られる。Neumeister ら(1997)は、*L. longbeachae*、*L. jordanis*、*L. anisa* を細胞内増殖しないタイプ、*L. bozemanii*(WLGA)、*L. micdadei*、*L. gormanii* を感染後、細胞内菌数が減少するタイプ、*L. dumoffii* を徐々に菌数増加す

るタイプ、*L. pneumophila* SG1、2 および 6 を高い増殖性を示すタイプに分類している。*L. longbeachae* に関しては本研究結果と異なるところであるが、*L. bozemanii* (WLGA) に関しては明らかに細胞内増殖性が低いことは本研究でも示された。低い細胞内増殖性を示す菌株に対しても十分な解析能力を示すことが、今後の課題となるところであり、この点に関しては感染後培養日数を考慮して(現在は 4 日間)、確実に細胞内増殖を確認するために日数を延長する、顕微鏡観察データと組み合わせる、などの工夫を加え、病原性を正確に評価することが必要と考えられた。レジオネラの感染性には温度、イオン環境も考慮すべき要素となるので、広範な菌種、血清型に対応可能な条件設定も引き続き検討する必要があると思われる。

宮崎のレジオネラ集団感染事例において調査時点では検出菌株に関する病原性データは存在せず、*L. pneumophila* SG1 の病原性の高さは一つの可能性として想定されていたが(岡田ら 2005)、分離株の *L. pneumophila* SG1 は強い病原性を有していたことは本研究で明らかとなり、本菌が主要な起因菌であったことの一つの裏付けとなった。当該の事例で分離された *L. londiniensis* は抗体価の上昇も認められず、またアメーバへの感染性もかなり低いことで病原性の低さが示唆されたが、一方で浴槽内において最も高濃度に存在していたという環境調査結果とは矛盾する結果となっている。この点に関しては、他のアメーバ属を宿主としている可能性もあり今後の検討課題である。このような事例調査の一環として検出菌の病原性評価を行なうことは、感染源対策あるいは原因究明に有用であると考えられる。次年度の課題としては、アメーバ

内増殖した株を用いた試験とデータの解析等をすすめる計画である。

E. 結論

新たなレジオネラの病原性解析の方法として開発した ID50 は、ヒト感染性の知られる代表的な菌種について病原性の強さを定量的に評価することが可能であった。*L. pneumophila* に関しては、感染源となりうる場所で高い病原性を有する菌の存在が明らかにされ、改めて環境中に存在する菌に対する注意と適切な対策が必要であることが確認された。

F. 参考文献

Gao L.Y., Susa M., Ticac B. and Kwaik Y.A. (1999) Heterogeneity in intracellular replication and cytopathogenicity of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* in mammalian and protozoan cells. *Microbial Pathogenesis*, 27: 273-287.

Moffat J.F. and Tompkins L.S. (1992) A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.* 60: 296-301.

Molmeret M. Jarraud S. Morin J.P. Pepnin P. Forey F. Reyrolle M. Vandenesch F. Etienne J. and Farge P. (2001) Different growth rates in amoeba of genotypically related environmental and clinical *Legionella pneumophila* strains isolated from a

thermal spa. *Epidemiol. Infect.* 126: 231-239.

Neumeister B. Schoniger S. Faigle M. Eichner M. and Dietz K. (1997) Multiplication of different *Legionella* species in mono Mac 6 cells and *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1219-1224.

岡田美香、河野喜美子、倉 文明、前川純子、渡邊治雄、八木田健司、遠藤卓郎、鈴木 泉(2005)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 I. 発生状況と環境調査、感染症学雑誌、79: 365-374.

Wadowsky R.M., Wilson T.M., Kapp N.J., West A.J., Kuchta J.M., States S.J., Dowling J.H. and Yee R.B. (1991) Multiplication of *Legionella* spp. in tap

water containing *Hartmannella veriformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1950-1955.

八木田健司(2006)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 - 厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業、主任研究者 遠藤卓郎) 平成 18 年度分担報告書

G. 健康危惧情報

なし

H. 研究発表

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表-1、本研究で使用したレジオネラ菌株の菌種ならびに血清型

菌種	菌株	血清型	分離源	備考
<i>L. pneumophila</i>	80-045	SG1	肺炎患者	国内事例分離
	985	SG1	冷却塔	
	998	SG1	冷却塔	
	NIIB374	SG1	肺炎患者	集団感染関連*
	NIIB378	SG1	浴槽水	集団感染関連
	#2427	SG6	浴槽水	集団感染関連
	#2428	SG8	浴槽水	集団感染関連
	#2429	SG8	浴槽水	集団感染関連
	#2430	SG8	浴槽水	集団感染関連
<i>L. dumoffii</i>	#2431		浴槽水	集団感染関連
	#2432		浴槽水	集団感染関連
<i>L. longbeachae</i>	NIIB56		ヒト剖検肺	Type strain
<i>L. bozemanii</i>	WIGA		ヒト剖検肺	Type strain
<i>L. londiniensis</i>	NIIB385		浴槽水	集団感染関連

*2002年に宮崎県にて発生したレジオネラ集団感染事例において分離された。