

図 2-1 B 県の 1 入浴施設の 1 浴槽（ヒノキ）における ATP 量の推移

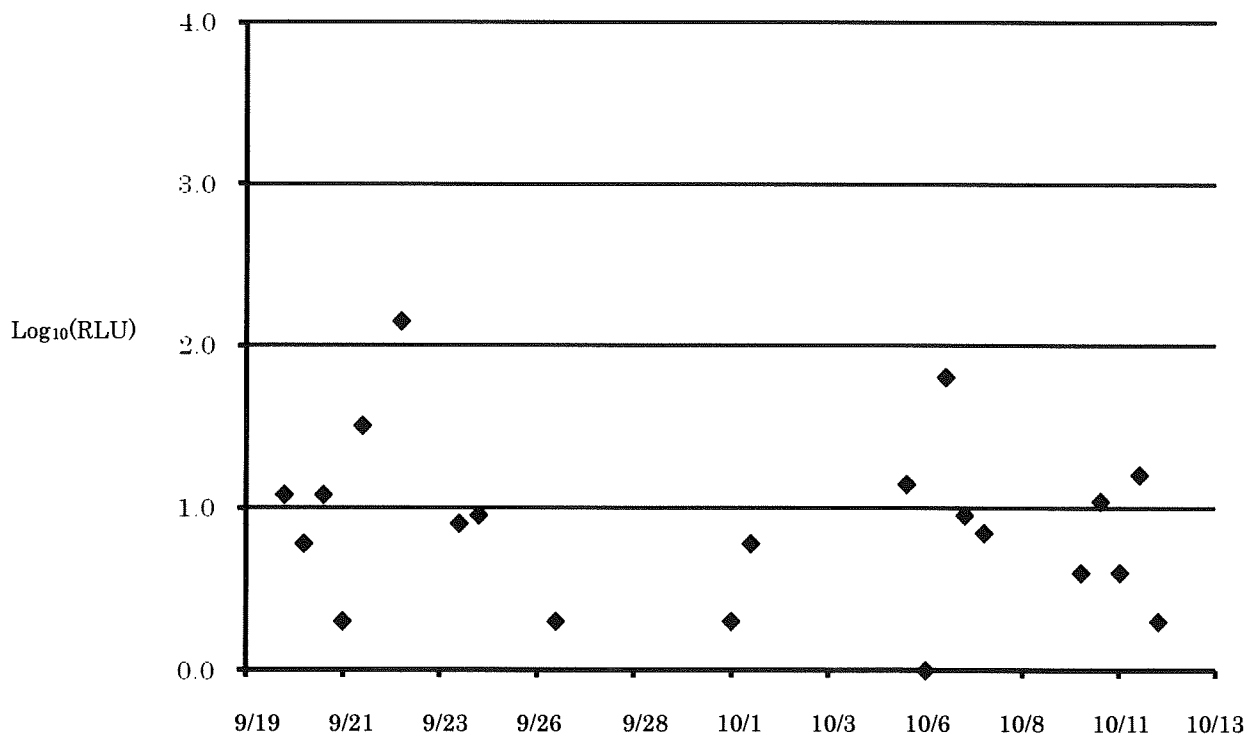


図 2-2 B 県の 1 入浴施設の 1 浴槽（陶器）における ATP 量の推移

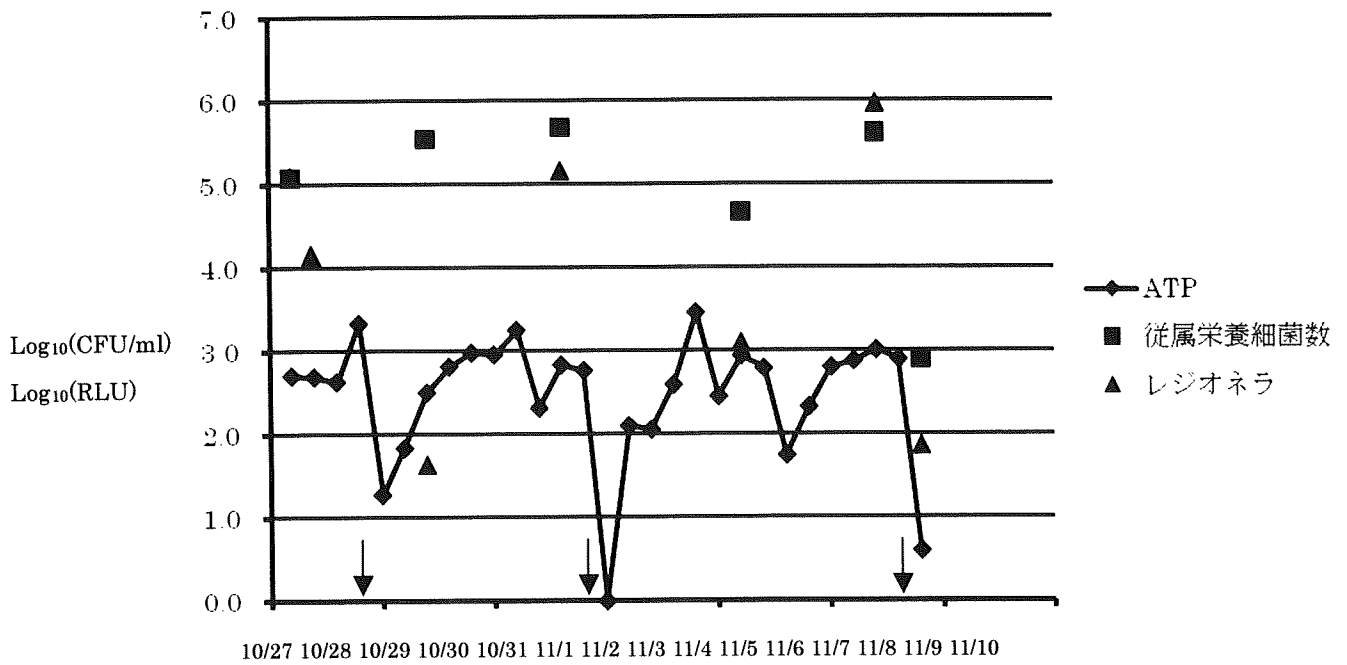


図 3-1 C 県の 1 入浴施設の 1 浴槽（大浴場）における ATP 量、従属栄養細菌数
 およびレジオネラ属菌数の推移
 ↓：清掃実施

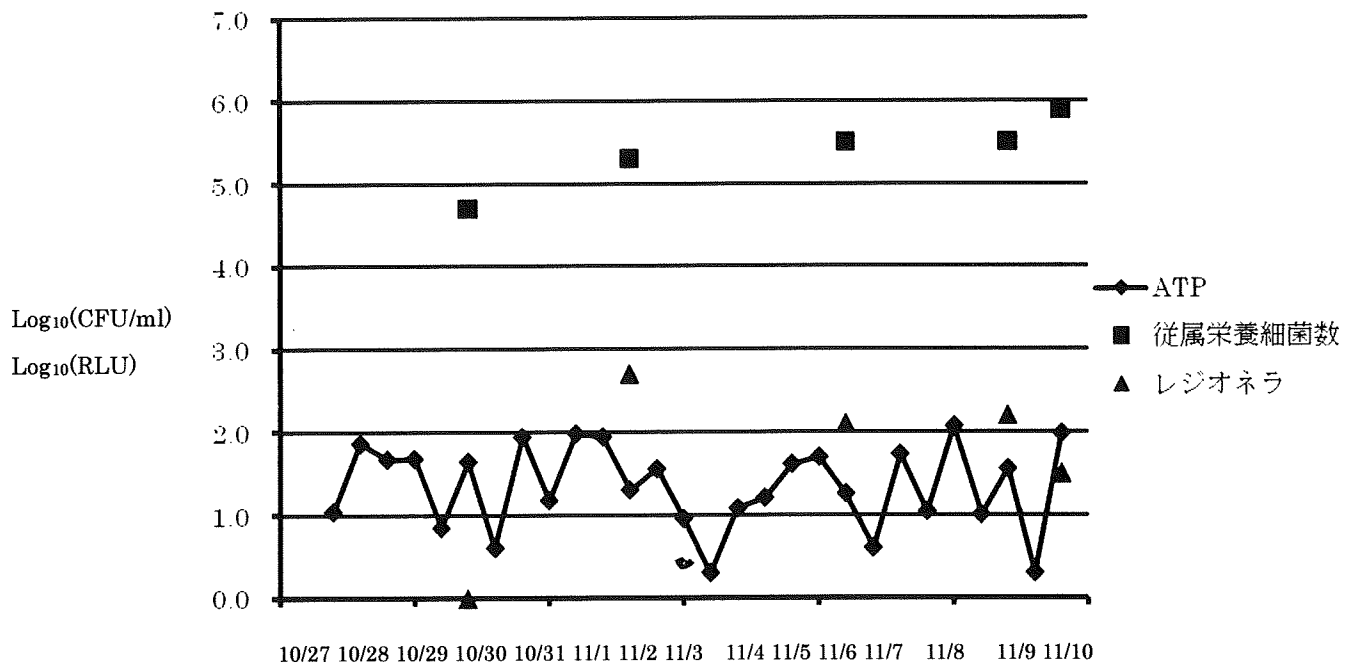


図 3-2 C 県の 1 入浴施設の 1 浴槽（ヒノキ）における ATP 量、従属栄養細菌数
 およびレジオネラ属菌数の推移

浴槽水のレジオネラ汚染指標としてATPを測定

レジオネラに汚染されているのか？
消毒や洗浄はうまくいっているのか？

レジオネラ培養検査で調べよう。
でも日数がかかってしまう。

頻繁に調べたい！
現場で調べたい！
すぐに結果を知りたい！

そこで

ATP検査
キットを使って浴場で検査
誰でも簡単
その場で判定

ATP検査の結果でレジオネラがいる危険性を判定します。
ATP検査は浴槽水中の細菌や入浴者に由来するATP量を測定します。
浴槽水中の菌数が多いと、レジオネラが増殖する危険性が高くなり、
細菌や汚れが多ければATP測定値は高くなります。
目標値は50RLUです。

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

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

Legionella pneumophila の遺伝子型およびモノクローナル抗体型の解析
-土壌分離株および臨床分離株と浴槽、冷却塔水分離株との比較-

研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	前川純子	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	常 彬	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	遠藤卓郎	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	菊川紀代己	埼玉県立大学 健康開発学科
研究協力者	古畑勝則	麻布大学 生命・環境科学部

研究要旨: *Legionella pneumophila* の遺伝子型別法である SBT (sequence-based typing) 法を用いて、土壌分離株 35 株について型別を行ったところ、12 種類の ST (sequence type) に分かれた。昨年度行った浴槽水分離株 40 株、冷却塔水分離株 48 株については、各々 28 種類、6 種類に分かれたので、浴槽水、土壌、冷却塔水分離株の順に多様性が高いことが分かった。共通の ST は各々の間で 1 種類ずつしかなく、生息域により ST の分布が異なることが示された。また、昨年度までに、本邦初発例（1980 年）から 2008 年までに分離された 86 株の臨床分離株の SBT を行ったが、今年度はレジオネラ・レファレンスセンターで新たに収集した 63 株（分離年は 2004 年から 2009 年）について型別を行った。合わせて臨床分離株 149 株は 96 種類の遺伝子型 (ST) に分けられ、本法の有用性が確認できた。臨床分離株と共通の ST は浴槽水分離株で 6 種類だったが、冷却塔水分離株で 1 種類、土壌分離株では 2 種類だった。欧米では給湯水や、冷却塔水からのレジオネラ感染が多いが、日本では入浴施設が主要な感染源となっている。日本では欧米に比べて臨床分離株の ST の多様性が高いことがわかったが、それは、欧米とは異なる感染源である浴槽水からの分離株の多様性を反映している可能性がある。

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。昨年度までに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 1 について、浴槽水分離株の遺伝子型別を行ない、特徴づけし、また、冷却塔水分離株についても型別を行い比較検討してきた。今年度は土壌分離株についても型別を行い、浴槽水分離株と比較した。土埃からレジオネラが混入する可能性が従来から指摘されており、土壌が浴槽水の汚染源である可能性がある。また、レジオネラ・レファレンスセンターにおいてレジオネラ症患者由来の臨床分離株の収集を行っており、収集された *L. pneumophila* の型別結果から、環境分離株との比較検討を行った。血清群 1 の株についてはモノクローナル抗体 (MAb) 型別も行った。本研究の目的は、各分離株の遺伝子型の特徴を明らかにすること、および本法の疫学的有用性を確認することにある。さらに、臨床分離株と環境分離株を比較することにより、病原性の高い遺伝子型を明らかにし、浴場等の衛生管理につなげる可能性についても言及する。

B. 研究方法

レジオネラ・レファレンスセンターで新たに収集した 2004 年から 2009 年に分離された *L. pneumophila* 臨床分離株 63 株、および 2001 年に日本各地から分離された *L. pneumophila* 血清群 1 の土壌分離株 35

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^{1,2)}。*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-b-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)、*neuA* は N-アシルノイラミン酸シチジルトランスフェラーゼ (*N*-acylneuraminate cytidyltransferase)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³⁾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。さらに、遺伝子型別による菌株間の類縁関係を示すため、BioNumerics (Applied Maths) を用いて、1 遺伝子のみが異なる ST 間をまず最小の長さの枝でつなぎ、それ以上の差異をもつ ST 間を差異数に比例した長さの枝でつなぎ、枝の合計の長さが最小になるように minimum spanning tree を作成した。

血清群はデンカ生研のレジオネラ免疫血清 (1~15) により決定した。土壌分離

株については、血清群 1 の株について解析をおこない、臨床分離株は入手したものを血清群によらず、すべて解析した。臨床分離株は複数の患者が発生した事例については 1 株のみ検査したが、逆に 2 種類の株が得られた患者および、3 種類の株が得られた患者由来の株はすべて検査したため、患者数は 60 名である。

血清群 1 の株については 6 種の MAb による型別⁴⁾をドレスデン工科大学のユージェン・ヘルビツ博士との共同研究として行った。本型別により血清群 1 の菌は 9 種類のサブグループに分けられる(図 1)。

C. 研究結果

SBT により遺伝子型別を行った。土壌由来株 35 株は 12 種類に型別された(表 1)。1 株は *neuA* が PCR で増幅できなかつたため、ST を決定することができなかつた。最も多かつた ST は ST48 で 9 株、続いて ST739 が 6 株、ST22 が 5 株であった。Minimum spanning tree 法で解析を行ったところ、土壌由来株は ST48 complex、ST739 complex、ST22・ST448 complex の大きく 3 つのグループに分けられた(図 2A)。

臨床分離株 63 株は 51 種類に型別され、多様であった(表 1)。ST505 が 4 株と最も多く、次いで ST138 と ST384 が 3 株で、2 株存在した ST が 5 種類あった。残りの 43 種類の ST は 1 株のみであった。臨床分離株の血清群の内訳は、血清群 1 が 54 株、血清群 2、3、4、6 が各 2 株、9 が 1 株であった。

血清群 1 の臨床分離株および土壌分離株について MAb 型別を行った。臨床分離株 54 株は 7 つの MAb 型に分かれ、最も多かつたのは Benidorm 28 株(51%)で、次いで Allentown/France 12 株(22%)だった。土壌分離株 35 株は 6 種類の MAb 型に型別された。このうち OLDA が 18 株(51.4%)で、Bellingham が 11 株(31.4%)を占めた。由来により MAb 型の頻度が異なっていた(表 2)。

病原性に関連すると考えられている MAb 3/1⁷⁾に着目すると、臨床分離株は陽性が 93%(50 株)だったのに対し、土壌分離株は陽性が 5 株(14.3%)、陰性が 30 株(85.7%)で、MAb3/1 陰性が多かつた。

D. 考察

昨年度までの結果も合わせた考察を以下に述べる。

1) 臨床分離株の遺伝子型について

昨年度までに調べた臨床分離株 86 株は 53 種類に型別された。ST1 が 7 株と最も多く、次いで ST306 が 6 株だったが、今年度調べた臨床分離株 63 株のなかにはどちらも見られなかつた。ST1 は 2008 年に 1 株分離された以外は全て 2000 年以前に分離されており、今年度調べた臨床分離株は 2004 年以降に分離されたものなので、ST1 の分離数が近年減っていることが示唆される。ST306 はすべて 2000 年以降に分離されており、今年度の調査で見られなかつたことの説明はつかなかつた。また昨年度までの調査では、ST120 と ST138 が次いで多く、各 5 株見られたが、今年

度の調査でも ST120 が 2 株、ST138 が 3 株見られた。ST120 は 1980 年代から、2006 年までコンスタントに分離されているのに対し、ST138 はすべて 2000 年以降に分離されていて、年次推移が異なっていた。逆に、今年度の調査で最も多かった ST505 (4 株) は前年度までの調査では見つからなかった。分離年は 2005 年から 2008 年と複数年にわたるものの特定の県に分布がたよっており、前年度まではその地域の分離株がなかったため、異なる結果になったのかもしれない。今年度の調査で次に多かった ST384 (3 株) は前年度までの調査でも 1 株見られており、年度は 2005 年から 2008 年だったが、地域性は見られなかった。3 年間の調査で計 149 株の臨床分離株が 96 種類の遺伝子型 (ST) に分けられた。

2) 環境分離株の遺伝子型について

昨年度までに調べた冷却塔水分離株 48 株は 6 種類に型別され、多様性に乏しく、37 株 (77.1%) が ST1 であった。ST1 以外の株についても 1 株 (ST48) を除いてそれらの遺伝型は互いに似通っていて 1 つの complex を形成しており (図 2 A)、冷却塔の環境に適応的な遺伝子型のものが広く分布しているのであろうと考えられた。昨年度までに調べた浴槽水分離株 40 株の SBT は 29 種類に型別され、多様であった。最も多かったのは ST1 が 6 株で、次いで ST599 が 3 株だったが、温泉由来株はその中になかった。冷却塔や浴槽へ土埃とともにレジオネラが混入すると考えられており、土壌由来株はほかの

株と共通の遺伝子型が多く見られることが期待されたが、土壌分離株は特有の遺伝子型を示し、しかも浴槽水由来株や臨床分離株ほどの遺伝的多様性は見られなかった。株数の多かった ST48、ST739、ST22 は遺伝的に互いに離れていたが、それ以外の遺伝子型 9 種類のうち 8 種類は前出の 3 つの ST のいずれかと遺伝的に近縁であった。土壌株が大きく 3 種類の遺伝子型に分かれた理由は不明であるが、それぞれ異なる環境に適応しているのかもしれない。今年度に調べた土壌分離株の結果も合わせると、環境分離株各由来間で共通の ST は 1 種類ずつだった (浴槽水と冷却塔水分離株では、ST1、浴槽水と土壌由来株では ST129、冷却塔水と土壌由来株では、ST48)。

3) 臨床分離株と環境分離株の遺伝子型の比較および方別法の有用性について

臨床分離株と環境分離株の遺伝子型を比較すると、ST1 は臨床分離株、冷却塔水分離株、浴槽水分離株から検出され、ST352 および ST593 は臨床分離株と土壌分離株とから共通に検出された。ST92、ST122、ST131、ST138、ST141、ST278 は、臨床分離株と浴槽水分離株から共通に検出された。ST138 (3 株)、ST141 (1 株)、ST278 (1 株) の臨床分離株の感染源が患者の入浴した温泉であることが、地衛研で行われたパルスフィールドゲル電気泳動解析⁶⁾により、確定している。臨床分離株と共通の遺伝子型の種類が、浴槽水分離株で 7 種類、土壌分離株で 2 種類、冷却塔分離株で 1 種類だったこととわが国

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は矛盾しない。臨床分離株の ST1 および ST120 の株の感染源はすべて不明であったが、ST138 の 8 例のうち 7 例、ST306 の 6 例のうち 5 例について、感染源が浴槽水と確定あるいは推定されていて (図 2B)、患者分離株の ST と感染源には関連があると考えられ、逆に感染源不明の患者の感染源の推測も可能であることが示唆された。

水道水等を用いていることが多い公衆浴場の浴槽水分離株では、冷却塔水に多い ST1 株が多く検出されたが、温泉が感染源であった患者由来株と共通の遺伝子型、ST138、ST141、ST278 の株も見いだされた。温泉ではない浴槽水についても、水温、あるいは人が入浴することによる有機物等の持ち込みなど、温泉と似た要素が多く、冷却塔水分離株と一部共通遺伝子型の株がみられるものの全体的には温泉同様の遺伝的多様性が存在すると考えられた。

型別の分解能を示す IOD (index of discrimination)⁹⁾を計算すると、臨床分離株 (前年度までと今年度分すべてを含む 149 株) については 0.989 となり、型別法として有用であることが示された。土壌分離株についても 0.886 となり、ある程度の分解能を示した。昨年度の結果から、浴槽水分離株については、IOD=0.972 となり、高い分解能を示したが、冷却塔水分離株については 0.401 となり、冷却塔水分離株の識別を行うには本法は不十分だと

考えられた。諸外国の臨床分離株の SBT の IOD は、英国で 0.901、アメリカで 0.946、カナダでは 0.964 で、本研究と比較して同等かやや低い値となっている。冷却塔水や給水・給湯設備などのレジオネラ症の感染源となりうる人工水から分離された株についての諸国の結果は、英国で IOD=0.933、アメリカで 0.822、カナダで 0.866 (同時に自然水分離株についても行われていて、その値は 0.974) であった⁸⁻¹⁰⁾。日本では欧米に比べて臨床分離株の ST の多様性が高いことが示されたが、それは、欧米とは異なる感染源である浴槽水からの分離株の多様性を反映している可能性がある。

4) MAb 型別法について

MAb 型については、浴槽水分離株は 9 種類すべての MAb 型に分かれ、最も多かったのは Bellingham (42%) だった。冷却塔水分離株は 4 つの型のみで Oxford が 73% を占めた。土壌分離株は OLDA が一番多く、臨床分離株は Benidorm が一番多かった (臨床分離株の MAb 型別の分布は前年度までと今年度の結果で特に違いは見られなかった) ので、由来により MAb 型の分布は全て異なることがわかった (図 3)。

遺伝子型、MAb 型ともに、環境分離株と臨床分離株との間で、その分布や頻度がそれぞれ異なっていた。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* の特定の株がレジオネラ症の発生に関与していると考えられる。臨床

分離株は MAb3/1 陽性株が 85%を占めていたのに対し、環境分離株の陽性率は 2-23% (浴槽水分離株が 23%、冷却塔水分離株が 2%、土壌分離株が 14%) と低かった。MAb3/1 陽性か否かを DNA レベル¹⁰⁾で判定する系が開発できれば、環境水に MAb3/1 陽性株が存在するか迅速に検査することができ、有用であると考えられる。

E. 結論

わが国のレジオネラ症患者からの *L. pneumophila* 臨床分離株と、土壌由来の *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株について 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。また、遺伝子型、MAb 型ともに、環境分離株と臨床分離株との間で、その分布や頻度が、それぞれ異なっていた。環境に生息している *L. pneumophila* の特定の株がレジオネラ症の発生に関与していることが示唆され、冷却塔水、土壌由来株より浴槽水由来株が、より関与していると推測された。その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矛盾しない。

謝辞

今回解析した菌株を分与くださった安形則雄、磯部順子、岩渕香織、小笠原準、奥野ルミ、金澤祐子、金澤裕司、金子紀子、鳥谷竜哉、河野喜美子、小堀すみえ、小山敏枝、中嶋 洋、沼田 昇、藤田直

久、山本一成、渡辺祐子 (敬称略) の諸氏に感謝いたします。

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) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. 2007. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J. Clin. Microbiol. 45:1965-8.
- 3) http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_home_page.php
- 4) 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.
- 5) Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin.

- Microbiol. 26:2465-6.
- 6) Chang B, Amemura-Maekawa J, Watanabe H. 2009. An improved protocol for the preparation and restriction enzyme digestion of PFGE agarose plugs for the analysis of *Legionella* isolates. JJID. 62:54-6.
 - 7) 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.
 - 8) Harrison TG, Afshar B, Doshi N, Fry NK, Lee JV. 2009. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 28:781-91.
 - 9) Kozak NA, Benson RF, Brown E, Alexander NT, Taylor TH Jr, Shelton BG, Fields BS. 2009. Distribution of lag-1 alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. J Clin Microbiol. 47:2525-35.
 - 10) Reimer AR, Au S, Schindle S, Bernard KA. 2009. *Legionella pneumophila* monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types isolated in Canada between 1981 and 2009: Laboratory Component of National Surveillance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Published online: 4 December 2009. DOI 10.1007/s10096-009-0840-3

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Jürgen H. Helbig, Bin Chang, Noriko Kaneko, Yuko Watanabe, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Kimiko Kawano, Hiroshi Nakajima, Yuki Tada, Haruo Watanabe, and the Working Group for *Legionella* in Japan. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups, and sequence types. J. Med. Microbiol. (in press).

2. 学会発表

- 1) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Jürgen H. Helbig, Bin Chang, Noriko Kaneko, Yuko Watanabe, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Kimiko Kawano, Hiroshi Nakajima, Yuki Tada, and Haruo Watanabe. Distribution of serogroups, sequence types, and monoclonal antibody subgroups among

Legionella pneumophila isolates from patients in Japan. LEGIONELLA 2009. Paris, France. October 2009.

- 2) 前川純子、倉 文明、常 彬、多田有希、金子紀子、渡辺祐子、磯部順子、貫名正文、中嶋 洋、河野喜美子、渡辺治雄、レジオネラ・ワーキンググループ：わが国のレジオネラ症患者由来株の血清群、遺伝子型、モノクローナル抗体型の分布. 第58回日本感染症学会東日本地方会学

術集会. 東京、2009年10月.

- 3) 前川純子、倉 文明、常 彬、菊川紀世己、渡辺祐子、磯部順子、貫名正文、中嶋 洋、河野喜美子、村井美代、渡辺治雄： *Legionella pneumophila* の遺伝子型別による菌株の解析. 第83回日本細菌学会総会. 2010年3月, 横浜 (予定).

H. 知的所有権の取得状況

なし

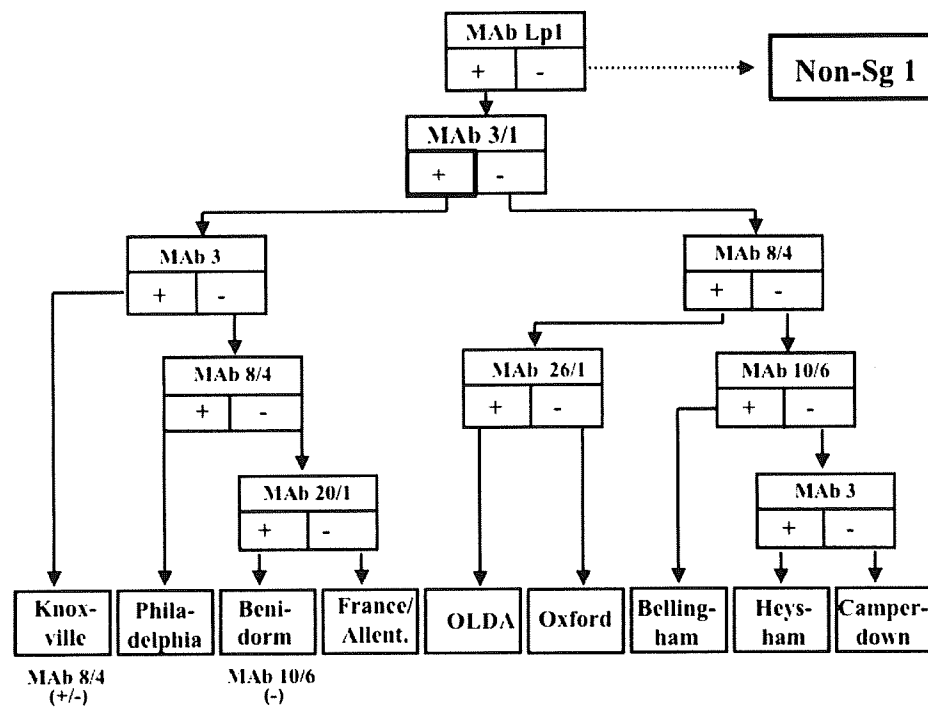


図1. 6種のモノクローナル抗体を用いた *L. pneumophila* 血清群1の型別のチャート図 (文献5の図を改変)。

表 1. 臨床分離株と土壌分離株の ST の分布

ST	臨床分離株	土壌分離株	MAb
48	0	9	Bellingham
739	0	6	OLDA
22	0	5	OLDA
505	4	0	Benidorm
138	3	0	Allent./France, Benidorm
352	1	2	Allent./France
384	3	0	Benidorm
448	0	3	Benidorm, OLDA, Oxford
593	1	2	OLDA
120	2	0	Benidorm
129	0	2	Bellingham
132	2	0	Allent./France
353	2	0	Knoxville
445	0	2	OLDA
507	2	0	Allent./France, Benidorm
609	2	0	Philadelphia
Others	41	4	Allent./France, Bellingham, Benidorm, Knoxville, OLDA, Oxford, 血清群 2, 3, 4, 6, 9
合計	63	35	

表 2. 臨床分離株と土壌分離株におけるモノクローナル抗体型の分布

MAb 型	臨床分離株	土壌分離株
Allent./France	12	3
Bellingham	1	11
Benidorm	28	1
Knoxville	6	0
OLDA	1	18
Oxford	2	1
Philadelphia	4	1
小計	54	35

A.

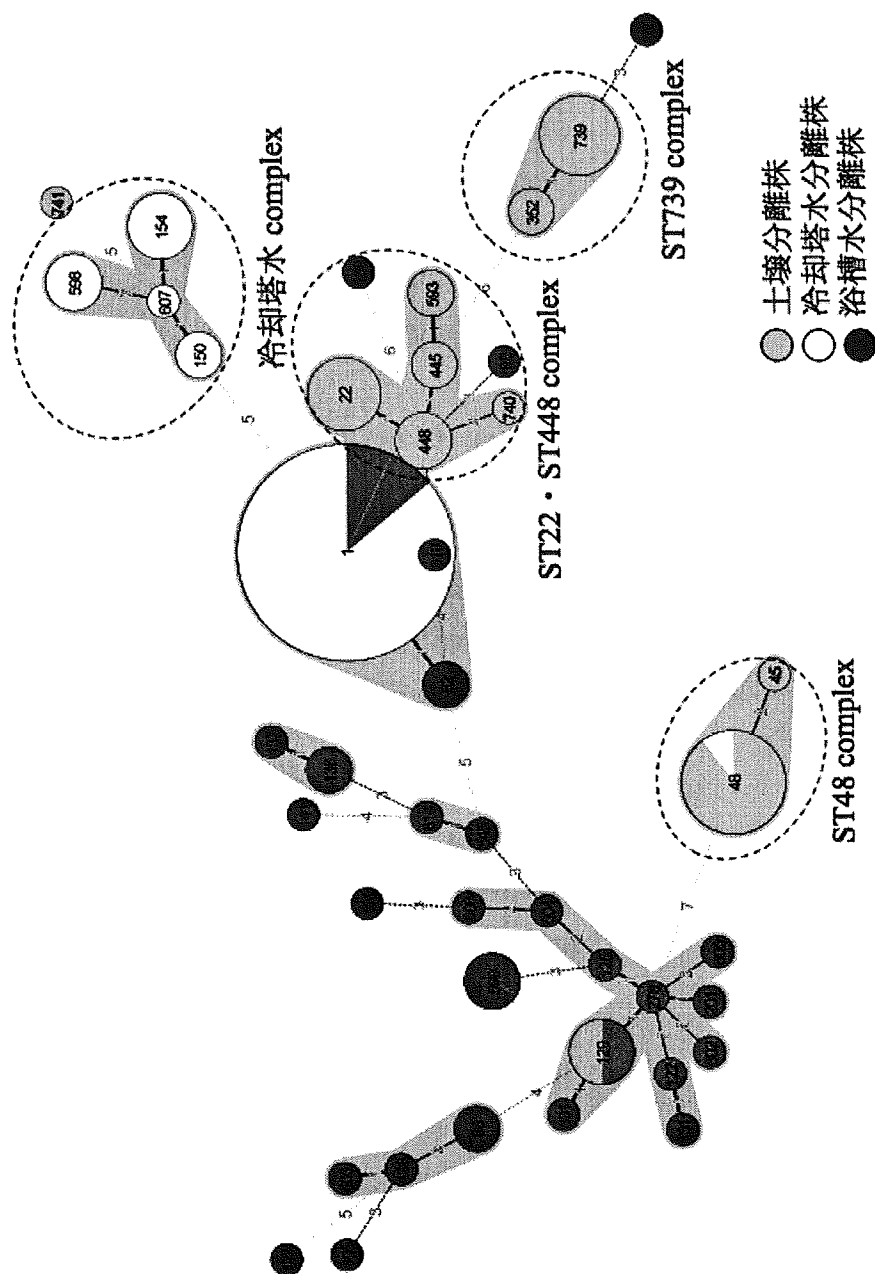


図2 Minimum Spnning tree 法による *L. pneumophila* 分離株の ST 同士の類縁関係。円の中の数字は ST ナンバーを示し、その大きさはそれぞれの ST を有する株数に比例している。“枝”の長さは互いの ST で異なる遺伝子座の数に比例している。隣り合う遺伝子座の違いが 2 つ以下の ST およびそれらをつなぐ枝の周囲は灰色に塗られ、complex を形成していることを示している。

A: *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株の ST 同士の類縁関係。今年度調べた土壌分離株 (35 株) と昨年度調べた浴槽水分離株 (40 株) および冷却塔水分離株 (48 株) の結果を示した。

B.

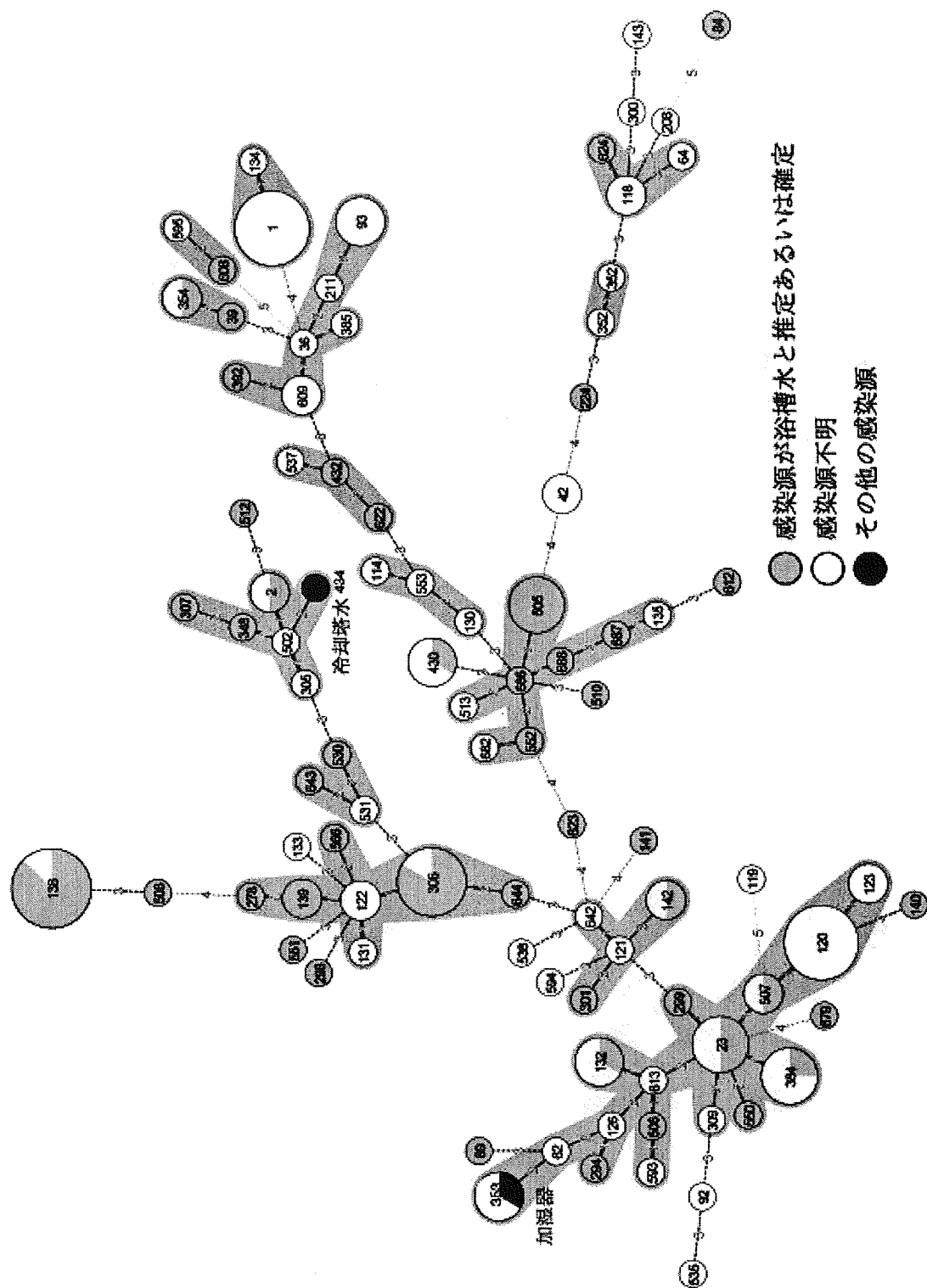


図2 Minimum Spanning tree 法による *L. pneumophila* 分離株の ST 同士の類縁関係。

B: 臨床分離株の ST 同士の類縁関係。3 年間で検査した 149 株のうち、*neuA* が増幅されず、ST が決定できなかった 8 株を除いた 141 株の結果を示す。

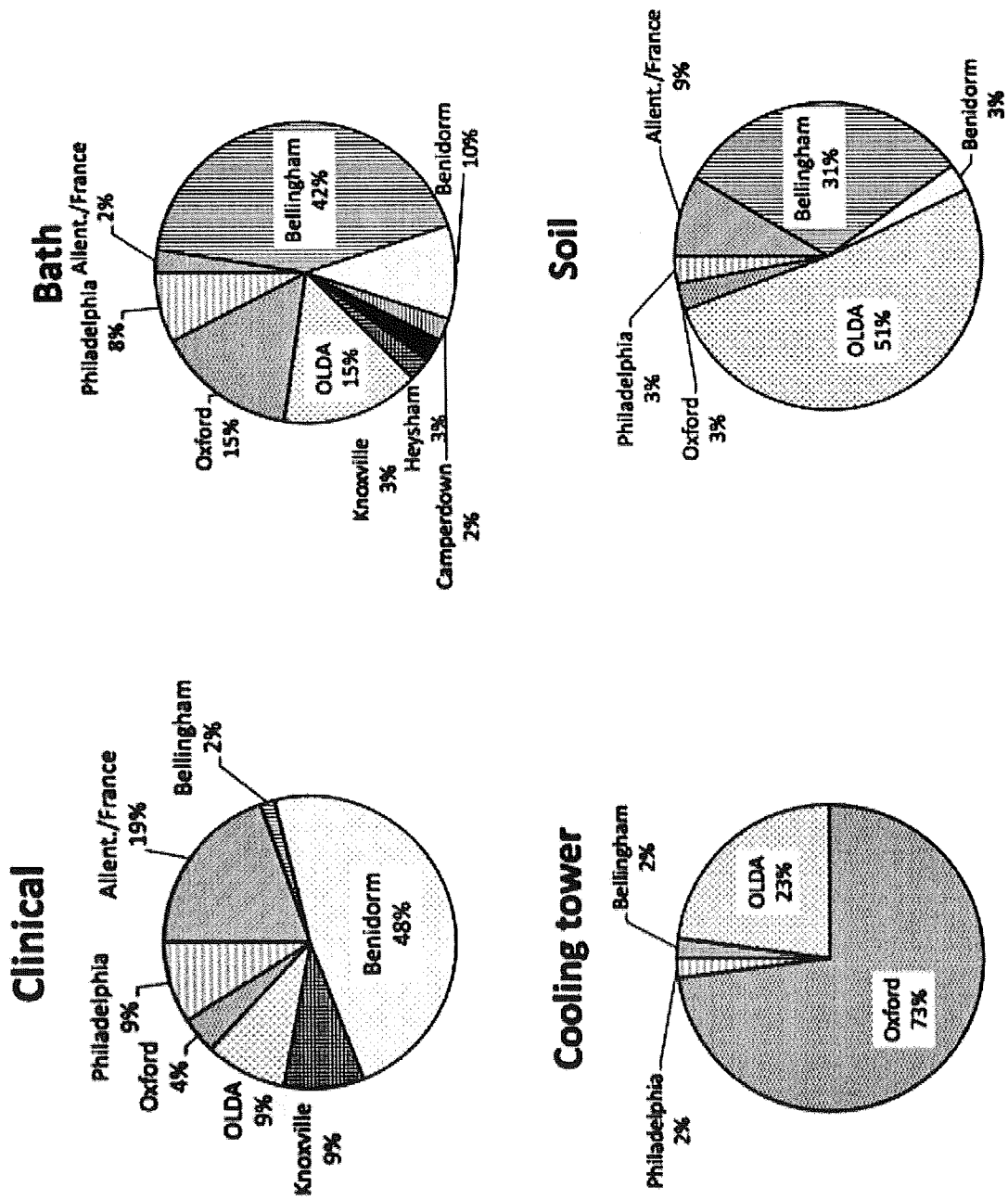


図3 *L. pneumophila* 血清群1の臨床分離株123株および環境分離株（浴槽水分離株40株、冷却塔水分離株48株、土壌分離株35株）におけるモノクローナル抗体型の分布

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
迅速・簡便な検査によるレジネオ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 21 年度分担研究報告書

検査法の検討 4 効率の良い集落観察法の普及と検討
分離培地の保存に関する検討

研究分担者 森本 洋 北海道立衛生研究所

－効率の良い集落観察法の普及と検討－

研究協力者	磯部 順子	富山県衛生研究所
	岩淵 香織	岩手県環境保健センター
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	佐々木美江	宮城県仙南・仙塩広域水道事務所
	瀬戸 順次	山形県衛生研究所
	柳沼 幸	福島県衛生研究所
	矢崎 知子	宮城県保健環境センター

研究要旨

効率の良い集落観察法の普及と検討：一昨年度報告書において提案した「効率の良い集落観察法(斜光法)」¹⁾について、昨年度に引き続き、他県地方衛生研究所等の協力のもと、研修会及び各地研で実際の検体について本観察法を組み込んだ検査の結果をもとに、その長所、短所、改良点、活用方法の検討を行った。本年度は、「特に発育早期のレジオネラ属菌集落の確認に重点を置いた観察を行う。さらに”斜光法”単独の結果およびコロニー PCR と併せた結果から、定性的な培養法の短縮が可能か検討する。」というテーマに主眼を置いた。その結果、定性までの時間短縮、より正確な定量結果を報告することが可能となった。また、コロニー PCR を併用することで、さらに正確で迅速な結果判定が可能となる場合があった。

分離培地の保存に関する検討：市販分離生培地の有効消費期限が製造後ほぼ3ヶ月間であることから、分離培地製造後3ヶ月間保存中に培地性能が変化するかどうかを検討した。今回確認した培地においては、適切な保存を行えば、製造後3ヶ月間はレジオネラ属菌の発育性能が保持されていた。一方で、選択分離培地では、非選択分離培地に比べ、一定の割合で発育が抑制される結果が得られた。

A. 研究目的

一昨年度、本研究事業報告書において、新たなレジオネラ属菌コロニー観察法を提

案した。報告概要を以下に示す。多くのレジオネラ属菌検査マニュアル²⁻⁶⁾には、コロニーの特徴として“大小不同、灰白色湿潤

コロニーで特有の淡い酸臭がある”以下、従来法)と記載されている場合が多い。しかしながら、実際の検査においては、他の細菌との区別が困難な場合が少なくない。そこで、より正確で簡便な方法を提案した。分離培地上の出現コロニーに斜光をあて、実体顕微鏡で観察すると、レジオネラ属菌は特徴的な形態(外観構造)を示す(以下、斜光法)。この方法を用いると、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、さらに釣菌も効率良く行うことができた。現在報告されているすべてのレジオネラ属菌を確認していないこと、また環境試料中には様々な細菌が存在しており、本特徴に類似の形態を示すコロニーが発育することもある。しかし、今回の検査結果では、環境試料から12種類の*L. pneumophila*血清群およびその他15種類以上のレジオネラ属菌が効率良く検出され、さらにレジオネラ肺炎の患者から最も高率に検出されている*L. pneumophila*血清群1において、この形態的特徴が観察されたことから、通常の検査業務に十分対応できる方法であり、感染源や汚染源を調査する際の有効な検査法の一つであると報告した。

本年度は、昨年度に引き続き、他県地方衛生研究所等の協力のもと、研修会及び各地研で実際の検体について斜光法を組み込んだ検査の結果をもとに、その長所、短所、改良点、活用方法の検討を行った。本年度は、「特に発育早期のレジオネラ属菌集落の確認に重点を置いた観察を行う。さらに”斜光法”単独の結果、及びコロニーPCRと併せた結果から、定性的な培養法の短縮が可

能か検討する。」というテーマに主眼を置いた。

培地の保存に関する検討の一環として、市販分離生培地の有効消費期限が製造後ほぼ3ヶ月間であることから、分離培地製造後3ヶ月間保存中に培地性能が変化するかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) 効率の良い集落観察法の普及と検討

1. 斜光法研修会研究協力者の招集

斜光法のより効果的な活用法を検討し普及させることを目的とするため、昨年度実績の高かった地方衛生研究所を中心に協力を依頼し、計7カ所の地方衛生研究所等の参集のもと研修会を開催した。

2. 研修会概要

開催日：平成21年9月2日～3日

場所：北海道立衛生研究所微生物部

内容：レジオネラ属菌の培養には、GVPC寒天培地(MERCK：生培地)、MWY寒天培地およびBCYE α 寒天培地(OXOID：レジオネラCYE寒天基礎培地にサプリメントを指示通り溶解、添加し調製)を使用した。これらの培地で、実際の温泉水および北海道内の浴槽水を由来とする9種類のレジオネラ属菌野生株(*L. pneumophila* SG 1、SG 5、SG 6、*L. maceachernii*、*L. feeleii*、*L. micdadei*、*L. rubrilucens*、*L. cherii*、*L. londiniensis*)を培養し、発育したコロニーを観察した。観察は、暗室で行い、コールドライト、実体顕微鏡を使用した(斜光法)。今回は、特に発育早期のレジオネラ属菌コロニーの確認に重点を置いた観察を行った。発育コロニーの形態的特徴により、レジオネラ属菌と推定されたものに対し、コロニーPCRを

行い”斜光法”単独の結果、およびコロニーPCRと併せた結果から、定性的な培養法の短縮が可能か検討した。

研究協力機関には、レジオネラ属菌検査を行う際、各施設の標準作業書工程中に斜光法を加えた検査も実施してもらい、実際の検査における有効性の検討を依頼した。

2) 分離培地の保存に関する検討

実験の基準株として、GIFU strainである *Legionella pneumophila* GTC296 (血清群1)、温泉水由来 *L. pneumophila* 血清群1 および *L. micdadei* の3種類を供試した。分離培地として、自家調製した非選択分離培地(BCYE α 培地)と MWY 培地 (共に Oxoid)、および GVPC 生培地(Merck)を使用した。製造直後の GVPC 生培地を400枚購入し、その搬入日(製造10日目)に合わせて BCYE α 培地と MWY 培地を各250枚調製した。培養2日目の供試菌株を滅菌精製水中でマクファーランド1.0に調整し、その後、滅菌精製水で10段階希釈した。 $10^4 \sim 10^6$ 倍希釈液をそれぞれ100 μ L ずつ3種類の培地2枚ずつに接種し、10日間培養し、菌数測定をした。この実験を培地保存期間(3ヶ月間)中、GVPC 生培地搬入日を実験初日とし、その後、10日ごとに行った。結果判定は、実験当日に調製した BCYE α 培地に同じく検体を接種し、菌数測定した結果を比較対照とし、この結果を100とした場合における、各培地の実験結果の割合を求めることで判定した。3ヶ月間の培地保存方法は、市販培地は搬入包装のまま(10枚ずつビニールで密封されたもの10組が1つの段ボール箱に入れられ、さらに段ボールの大箱に入れられた状態)4°Cで保存した(図1)。自家調製培地は、6枚ずつを1枚のビ

ニール袋に入れ、口を縛り、ポリプロピレン製の大型クーラーボックスに入れ、4°Cで保存した(図2)。なお、いずれの培地においても、一度ビニール袋から開封された培地については、開封当日以外での使用はしなかった。

C. 研究結果及び考察

1) 効率の良い集落観察法の普及と検討

研究協力機関から、自施設で取り組んだ斜光法の検討結果報告(資料添付)がなされた。それらを踏まえ、これまでに取り組んだ、斜光法の検討結果概要を以下にまとめる。

1. レジオネラ属菌の発育コロニーは特徴的な形態(外観構造:モザイク様)を有し、他の発育菌との判別が容易であった。他の菌の発育の多少にかかわらず、釣菌対象となるコロニー(微少なレジオネラ属菌様コロニーであっても)が限定され、効率良くレジオネラ属菌を確認することができると思われた。

2. 菌数測定が正確に行うことができると思われた。

3. 発育早期から確認が可能となる(培養2日目からの確認が可能であった報告が複数有り(図3))。これにより、定性的な判定日数を短縮できる可能性が示唆された。尿中抗原検査(Binax社)陰性であったが、強くレジオネラ症を疑う重症肺炎患者の喀痰から *L. pneumophila* SG2 を分離した事例で、その存在が培養2日目から確認されたとの報告があった。また、分離培地にカビが発育した場合には、培養日数の経過とともにカビが旺盛に発育し、検査に大きく影響を与えることがあるが、発育早期に確認可能な本法は、カビの影響を回避できる場

合があり、この点からも、有用な方法であると報告された。

4. 培養日数の経過により、コロニーの特徴が判別しづらくなる場合があることから、早い時期からの観察が良いと思われる。

5. 培養日数が経過しても、コロニーが大きくなりづらい場合に対応可能であった。

6. 一つの分離培地上に数種類のレジオネラ属菌が発育した場合、種類を特定することは難しいが、コロニーの発育時期、模様、色等、特徴の違いから、異なる種類を効率的に釣菌できる場合があった。

8. 従来法では、経験や個人の熟練度による差が大きかったが、斜光法ではこの点がかかり解消され、レジオネラ検査経験の浅い検査員でも、判定がしやすくなると思われる。

10. 臨床検査でも効率的なレジオネラ分離培養検査が期待できる。

11. 一方で、斜光法においても、コロニーの特徴が不確かで、判定に苦慮する場合もあり、疑わしい場合は釣菌して確認する必要がある。

12. スクリーニング的に斜光法を取り入れるのであれば、集落発生から決まった日数で観察することが重要であると考えられた。

13. 培養早期には目視で確認できないほどの微細な雑菌のコロニーが存在する可能性があり、コンタミネーションを考慮する必要がある。

14. 鏡検と判定に慣れる必要がある。

15. 特に分離培地（メーカー、種類）の違いにより、特徴が異なる場合がみられたことから、自施設で使用する分離培地を用いて、十分に検討する必要がある。

16. たくさんの検体を処理する場合は、分離培地の観察枚数が多くなることから、適切に検査を行うための工夫が必要である。

17. 鏡検時に観察しやすい事からシャーレの蓋を開けるが、この時にコンタミネーションを起こすことがあるので、工夫が必要である。

18. 簡便な観察法ではあるが、単独での判断は、誤判定につながる可能性がある。そこでコロニー PCR 法を併用することにより、さらに正確で迅速な結果判定が可能となった（釣菌時には、コロニーの大きさを考慮し、確実に菌体を採取しているか、培地成分を採取していないかなどに十分注意すること。）。

19. 斜光法とコロニー PCR 法の併用は、ルーチンで行っている環境水検査等の急を要しない検査に用いた場合、経費的な面を考慮しても非効率な側面が考えられるが、レジオネラ症集団発生時の原因施設調査等迅速性を求められる場面において、定性的な検査という位置付けで行うには非常に有用な方法であると考えられた。

以上のことから、特に定性検査においては、これまでの培養法に斜光法を組み込むことで迅速化が可能となり、患者由来検体にも効果的に利用できると考える。また、環境水等の検査では、定性的な考えと定量的な菌数測定結果の位置付けを明確にすることにより、迅速、正確な行政対応へ結びつけることができると思われた。

斜光法には実体顕微鏡は必須であるが、光源について、固定式のコールドライト以外での検討を行った結果、安価でスポットライトのように使用できるペン型の高光度 LED ライト（口径 7～10mm 白色）でも、簡

易的に確認することができた。

本斜光法は、観察場所と明所、暗所等の条件、使用培地、実体顕微鏡、斜光ライトなどについて、自施設の状況を十分に把握し、事前にレジオネラ属菌の集落形態を確認した上で、従来の培養法に組み込むことにより、効率的な検査結果が得られる方法と思われた。特にコロニー PCR 法との併用は、さらに正確で迅速な結果判定ができる場合があると思われた。今後は、各施設の検査体制や状況を考慮し、自施設に合った導入を検討することで、検査効率を上げることができると思われる。

なお、本年度研究協力者からの報告を資料として添付する。

2) 分離培地の保存に関する検討

結果を図4、表1に示した。3種類の供試菌株において、実験初日（BCYE α 、MWY 培地は保存0日目、GVPC 培地は保存10日目）と保存90日目の結果、保存0、10、20、30日での結果平均値（GVPC は後者3回分）、保存40、50、60日での結果平均値、保存70、80、90日での結果平均値、さらには保存90日間全体での結果平均値を比較した結果、有意な差は認められなかった。これらのことから、今回使用した培地においては、適切な保存を行えば、一般的に製品保証されている3ヶ月間は、レジオネラ属菌の発育性能が保持されていると思われた。生培地の保存では、特に結露と乾燥が問題となる場合が多いことから、メーカーによって梱包形態が異なること、開封後の保存のしかた、自施設冷蔵庫の性能と庫内状況などを十分に考慮したうえで保存し、実験前に使用に適切な状況であるかどうか判断する必要があると思われる。今回、数百枚の培地

を3ヶ月間確実に結露と乾燥なく保存しなければならなかったため、十分な予備実験を行った。その結果、自家調製した培地をビニール袋に入れて口を縛り、ポリプロピレン製の大型クーラーボックスに入れて4℃で保存をすると非常に良い結果が得られたことを報告する。

一方で、非選択培地である BCYE α 培地と選択培地である MWY 培地、GVPC 培地の出現菌数を比較すると、今回供試した *L. pneumophila* GTC296、*L. pneumophila* 血清群1、*L. micdadei* は、選択培地ではそれぞれ60%前後、80%前半、70~80%の出現率にとどまった。このことから、昨年度も報告したが、状況に応じ BCYE α 培地と選択分離培地を併用することが、効果的な検査結果につながると思われた。

D. 結論

1) 効率の良い集落観察法の普及と検討

分離集落の形態的特徴を利用して検査を行うことは、極めて効果的な検査方法である。本法は、十分に通常の検査業務に対応できる方法であるとともに、感染源や汚染源を調査するにあたり有効な検査法の一つであると思われた。特に、発育初期の微小集落にも対応できることから、定性までの時間短縮、より正確な定量結果を報告できることは、大きな成果と考える。さらにコロニー PCR 法を併用することで、形態的特徴で一次スクリーニングした集落を、より高い確率で確定判断できる場合がある。ただし、コロニー PCR 法の結果が陰性だったとしても、プライマーの特異性や培地成分の反応系への持ち込み、微小集落の釣菌ミス等による偽陰性も考えられることから、