

200942010B

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

平成19年度～平成21年度 総合研究報告書

研究代表者 倉 文 明

平成22（2010）年3月

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

平成19年度～平成21年度 総合研究報告書

研究代表者 倉 文 明

平成22（2010）年3月

目 次

I. 総合研究報告

- 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. 資料編

1. 迅速検査法の整備-----17
遠藤卓郎、泉山信司
2. 定量 RT-PCR 法を用いたレジオネラ属菌迅速検査法の検討-----46
遠藤卓郎、烏谷竜哉、泉山信司
3. Ethidium monoazide (EMA) または propidium monoazide (PMA) 処理とリアルタイム PCR のコンビネーションによる環境中のレジオネラ生菌のみを定量検出する方法に関する研究-----62
常 彬、前川純子、田栗利紹、杉山寛治
4. 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-----68
黒木俊郎、荒井桂子、杉山寛治、中嶋 洋、田栗利紹、緒方喜久代、佐々木美江、藤田雅弘、磯部順子
5. *Legionella pneumophila* の遺伝子型およびモノクローナル抗体型の解析
一浴槽、冷却塔水および土壌分離株と臨床分離株との比較-----77
前川純子
6. 検査法の検討-----88
森本 洋
7. ゼラチン・ディスク配布による菌数測定的外部精度管理-----127
渡辺祐子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----157

IV. 研究成果の刊行物・別刷-----159

I. 総合研究報告書

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）

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

研究代表者 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究要旨： わが国におけるレジオネラ症の集団発生は主として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、以下の検討を行い、成果を得た。

- 1) 市販の 2 種類のレジオネラ遺伝子検査試薬の反応特異性を検討した結果、わが国で分離されるレジオネラ属菌に関しては概ね検出することが示された。このキットを用いて浴槽水を数時間以内に検査できた。
- 2) 定量的 PCR (qPCR)法と培養法の検出菌数の間で相関は認められなかった。これは、培養法陰性、qPCR 法陽性の検体の存在による。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に限定すると、両検査法の散布図で R^2 は 0.99 となりよく相関していた。
- 3) 温泉水試料ではフミン質等による遺伝子増幅反応の阻害が懸念されることから、中性-弱酸性下のカラムによる核酸抽出法と、阻害回避試薬を使用したアルカリ熱抽出法の 2 つを提案し、有用性を確認した。
- 4) rRNA を鋳型とする定量逆転写 PCR (qRT-PCR) 法を開発し、感度を 1,000 倍以上高めることができ、阻害反応も回避できることが確認された。
- 5) Ethidium monoazide 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 PCR で増幅不能にすることができた。これによって、PCR で死菌は検出されなくなり、生菌のみ検出できた。
- 6) 液体培養と遺伝子検査法 (qRT-PCR) を組み合わせることで、選択的な生菌の検出が可能となった (Liquid Culture qRT-PCR)。
- 7) 菌株識別法であるパルスフィールド電気泳動法を改良し、結果が判明するまでの日数を 4 日から 2 日に半減させた。
- 8) バイオマスの指標としての ATP について、現場で浴槽水の ATP を測定して、レジオネラ汚染に関連し迅速に浴槽水を衛生管理する指標値を提案した。
- 9) 浴槽水の濃縮法として、免疫磁気分離法を従来のろ過法と比較し、雑菌の多い検体における有用性が示唆された。
- 10) *Legionella pneumophila* の遺伝子型別法とモノクローナル(Mab)抗体型別を実施し、浴槽、冷却塔、土壌という生息環境による環境分離株の特色、臨床分離株の特徴を明らかにした。
- 11) 一定の菌数の *L. pneumophila* を含んだゼラチンディスクを配布して、外部精度管理を実施した。検査工程の処理手順を具体的に示し回収率が向上した。遠心法よりろ過法、加熱処理より酸処理の回収率が良好であった。

- 12) ID50(50% Infectious-Dose)を用いて、レジオネラ属菌種間のアメーバ感染性を定量的に比較し、菌種・菌株と感染性の違いを見出した。
- 13) 効率の良い集落観察法（斜光法）を確立し、レジオネラ属菌の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。非濃縮検体の並行培養、非選択培地の活用によりレジオネラ検出率を高めた。
- 14) 市販 DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) キットで同定できないが、日本で分離されている *Legionella busanensis*、*Legionella gresilensis*、*Legionella londiniensis*、*Legionella nautarum*、*Legionella quinlivanii* の 5 つのレジオネラ属菌を、DDH 法により同定可能にした。本研究で検討した遺伝子検査法の成果の一部は、レジオネラ症防止指針第三版（（財）ビル管理教育センター）に記載された。また各種研修会で講義された。

研究分担者・所属機関及び職名

遠藤卓郎・国立感染症研究所客員研究員
 常 彬・国立感染症研究所主任研究官
 前川純子・国立感染症研究所主任研究官
 八木田健司・国立感染症研究所主任研究官
 山崎利雄・国立感染症研究所主任研究官
 荒井桂子・横浜市衛生研究所医務職員
 緒方喜久代・大分県衛生環境研究センター
 主幹研究員
 黒木俊郎・神奈川県衛生研究所専門研究員
 杉山寛治・静岡県環境衛生科学研究所
 微生物部長
 田栗利紹・長崎県環境保健研究センター
 主任研究員
 中嶋 洋・岡山県環境保健センター
 特別研究員
 森本 洋・北海道立衛生研究所研究職員
 渡辺祐子・神奈川県衛生研究所主任研究員

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幅阻害物質が問題とされてきた。

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 法を開発し浴槽水に応用した。

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し、遺伝子型別 (SBT) を行った。

B. 研究方法および材料

1. 標準菌

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 *Legionella 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℃、4日間培養した。35℃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。

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等の一部は遠心濃縮した。培養法は GVPC 培地で 37°C、5~7 日間培養した。一部には WYO α 培地や MWY 培地も用いて比較した。DNA の抽出は酵素溶菌法により行った。同時に遊離残留塩素濃度 (現場測定、DPD 法) を測定した。

3. DNA 抽出と DNA 増幅

DNA 抽出はアルカリ抽出法と酵素溶菌法の 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、Proteinase K により溶菌する。さらに DNA 回収用シリカ・カラムを使用した。一部にはキレックス樹脂の添加と加熱の手順で DNA を抽出した。

DNA 増幅法としては、リアルタイム PCR (ここではサイクリングプローブ法と通常のプローブ法) や LAMP 法を用いた。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。EMA-PCR 法では 16S rRNA 遺伝子を標的に molecular beacon probe を設定した。

4. 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 2 株 (*L. pneumophila* 1 株および *Legionella bozemanii* 1 株) を生理食塩水に

懸濁し、約 10^7 CFU/100mL の懸濁液を作製した。これらの菌液を遊離塩素 1ppm で室温 30 分処理し、死菌の調製を行った。レジオネラの生菌および塩素処理した死菌を含む懸濁液それぞれを 500mL の水道水に添加し、モックサンプルを作製した。一方、公衆浴場およびモデル浴槽から水サンプルを採集し、解析を行った。これらのサンプルは遠心により濃縮し、酸処理したサンプル 0.1mL を BCYE または GVPG 寒天培地に塗布し、37°C で培養した。濃縮サンプルに EMA を添加し、遮光下 4°C で 5 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 を標的とする qPCR による定量解析を行った。

5. *Legionella pneumophila* の遺伝子型の解析

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。菌株間の類縁関係を BioNumerics (Applied Maths) を用いて minimum spanning tree 法により解析した。

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. 研究結果および考察

1) 迅速検査法の整備

市販の 2 種類のレジオネラ遺伝子検査試薬の反応特異性を検討した結果、わが国で分離されるレジオネラ属菌に関しては概ね検出することが示された。一方、いずれの試薬においても培養で高濃度の汚染が確認されることのある *Legionella londiniensis* は検出されないことから別途に *L. londiniensis* 検出試薬を開発した。

現行の培養試験は 10cfu/100ml を基準とするが、迅速検査法では遺伝子の存在の有無、あるいはコピー数を測定するものであり、基準に対

応させるための較正方法が必要となる。基準株として *L. pneumophila* 長崎株 80-045 株を用いて培養条件を 30°C 4 日間培養したコロニーを用いて検量線を作成し、迅速検査法の定量化を確立した。さらに、感染アメーバから遊離した菌体を用いた場合もほぼ同じ検量線が得られた (図 1)。

浴槽水 366 試料(培養法で検出した菌数は 10~25,000cfu/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 (図 2)。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 (図 3)。 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。

また、qPCR の有効性はモデル浴槽におけるレジオネラの推移の測定でも確認された (図 4)。

温泉水試料ではフミン質等による遺伝子増幅反応の阻害が懸念されることから、核酸抽出酵素処理・カラム精製工程を中性-弱酸性下で行なうことによる核酸抽出法を提案した。一方、簡易な調製方法も求められており、アルカリ熱抽出法と反応回避試薬の組み合わせにより阻害の回避や軽減効果が得られた。

rRNA を鋳型とする定量逆転写 PCR (qRT-PCR) 法を開発し、感度を 1,000 倍以上高めることができた。高感度化することで抽出

過程で特段の処理を施さなくても阻害反応を回避できることが確認された。さらに、液体培養法と遺伝子検査法 (qRT-PCR) を組み合わせることで、選択的に生菌の検出も可能となった (LC qRT-PCR)。すなわち、濃縮試料水を液体培地で 18 時間程度前培養 (Liquid Culture: LC) し (図 9)、得られた培養液を用いて遺伝子増幅 (qRT-PCR) を行なう方法で、培養で陽性となった (生菌) 菌種のみを対象とした定量試験を浴槽水試料で可能とした (図 10)。

菌株識別法であるパルスフィールド電気泳動法を改良し、結果が判明するまでの日数を 4 日から 2 日に半減させた (論文 3)。

2) Ethidium monoazide (EMA) または propionium moniazide (PMA) 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 PCR で増幅不能にすることができた。これによって、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 (論文 2)。さらに、propionium moniazide (PMA) 処理およびリアルタイム PCR のコンビネーションも検討し、EMA は PMA と同等の結果であった (論文 8)。また、浴槽水試料の中に存在しているレジオネラは、EMA 等に感受性が高いので、死菌量に関係する塩素濃度により、EMA や PMA の使用量の調整が必要であった。

3) ATP 測定による入浴施設の汚染度のモニタリング

温泉施設の浴槽水中の 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 356 試料の従属栄養細菌数、ATP 量、レジオネラ属菌数を測定結果から、ATP 量が 50RLU を超えるとレジオネラ汚染率は 18% から 53% へと上昇を認めた。この指標値は、現場で迅速に浴槽を衛生管理する上で有用である (図 6)。

4) *L. pneumophila* の遺伝子型別法とモノクローナル抗体型別

L. pneumophila の遺伝子型別法である SBT (sequence-based typing) 法を用いて、浴槽水分離株 40 株、冷却塔水分離株 48 株、土壌分離株 35 株について型別を行ったところ、各々 28 種類、6 種類、12 種類の ST (sequence type) に分けられ、他の環境分離株より浴槽水分離株の多様性がまさっていた。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 の分布が異なった (図 7)。さらに、本邦初発例 (1980 年) から 2008 年までに分離された 149 株の臨床分離株の型別を行ったところ、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 (論文 7)。

5) 免疫磁気分離法

種々の泉質の温泉由来の浴槽水等 191 検体について、従来法 (ろ過法) と、新規の免疫磁気分離法 (immunomagnetic separation : IMS) の菌濃縮方法について比較検討した。IMS 法はろ過法に比べ、感度は 78.3%、特異性は 94.7% となった。ろ過法との両対数の散布図を示した (図 8)。ろ過法より回収率は低いが、雑菌の多い検体における有用性が示唆された。

6) レジオネラ属菌の培養検査に必要な外部精度管理

一定の菌数の *L. pneumophila* を含んだゼラチンディスクを配布して、外部精度管理を実施した。初年度、2 年度、3 年度に配布した機関数は各 7、8、30 であった。一部の検査工程の指定により、前年に続き 2 回目の参加となる地研は回収率が向上した。3 年度目には一部民間機関を含めて実施した。民間検査機関、初回参加の地研、3 回目の参加地研の間で回収率を比較

したところ、同程度の回収率のバラツキが認められた。なお、遠心法よりろ過法、加熱処理より酸処理の回収率が良好であった (表 1、2 年度の結果)。回収率のかなりの違いがあり各機関における検査方法に対する精度管理が必要であると考えられた。

7) レジオネラ属菌のアメーバ感染性を評価する方法である ID50(50 % Infectious-Dose)を用いて、宮崎の集団感染事例で分離されたレジオネラ属菌種間のアメーバ感染性を定量的に比較した。*Acanthamoeba* に対し *L. pneumophila* (SG1) が最も高い感染性を示したが、*L. londiniensis* は感染性が著しく低く、顕微鏡的には感染が認められなかった。このため、*L. londiniensis* の宿主アメーバの検索を行い、*Naegleria* 属のアメーバと一部の *Acanthamoeba* 株への感染性を認めた。冷却塔および温泉の生息環境に由来する *L. pneumophila* (SG1) 株とアメーバ株の適合性を予備的に検索したが、どちらの生息環境由来 *L. pneumophila* (SG1) 株も 2 つの生息環境由来アメーバに感染した。

8) 培養法の検討

効率の良い集落観察法 (斜光法) を確立した (論文 9、図 11)。分離培地上の出現集落に斜光を当て、実体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を示す。レジオネラ属菌と他の細菌との見極めが簡易になり、レジオネラ集落の確認、カウント、釣菌などが効率良く行えるようになった。培養法と遺伝子検査法を組み合わせ、早期のコロニーを遺伝子検査法でレジオネラと同定することにより、浴槽水の検査が 3~5 日で結果が得られるようになった (4~7 日間短縮できた)。

濃縮法については、ろ過濃縮による検出率の方が高い傾向にあった。また、非濃縮検体と濃縮検体を同時に検査する並行培養が有用であった。非選択培地である BCYE α を利用することで、効果的にレジオネラ属菌が検出された事例を示し、特に、清掃消毒後の浴槽水や温泉源泉等雑菌が少ないと考えられる検体に対し、

その効果が期待できた。3種の菌株を用いて確認した3種の寒天培地においては、適切な保存を行えば、製造後3ヶ月間は性能が保持された。

9) DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) 法によるレジオネラ属菌の同定

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ために、固定する基準株の選定、基準株より抽出した DNA のマイクロプレートへの固定法の検討、追加したレジオネラ属菌種の基準株間の相対類似度の測定・検査精度の検討を行った。*L. busanensis*、*L. gresilensis*、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii* の5菌種の DDH 法による同定が可能になった。この方法により、日本の環境水から分離された菌種不明のレジオネラ様菌株が *L. busanensis* 株と同定できた。

D. 結論

わが国におけるレジオネラ症の集団発生は主として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。現行の培養法では、結果判定までに1週間程度を要しているため、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、本研究では、迅速・簡便な検査について以下のように改善した。

浴槽水等のレジオネラを DNA 迅速検査により定量し、阻害物質の混入を避ける DNA 抽出法を選択し、検出感度を向上させた。また、リボソーム RNA を鋳型として検出する RT-qPCR (逆転写産物を鋳型とした定量 PCR) を行い、感度を 1000 倍向上させた。生菌を検出する DNA 迅速検査を開発して浴槽水中のレジオネラ数の測定を実施した。バイオマスの指標としての ATP について、現場で浴槽水の ATP を測定して、迅速に浴槽を衛生管理する指標値を仮設定した。菌株識別法であるパルスフィールド電気泳動法の結果の判明するまでの日数を半減させた。培養法と遺伝子検査法を組み合わせ、早期のコロニーを遺伝子検査法でレジオネラ

属菌と同定することにより、3~5 日で結果が得られるようになった (4~7 日間短縮した)。

核酸を検出する迅速検査は、死菌を検出する場合でもレジオネラの増殖があったことを示し日常の衛生管理に役立てることができる。また、集団感染事例の感染源のスクリーニングや閉鎖施設の再開にも利用できる。本研究で検討した遺伝子検査法の成果の一部は、レジオネラ症防止指針第三版 ((財) ビル管理教育センター) に記載された (書籍 1)。

E. 健康危険情報
なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Suzuki-Hashimoto A, Ichinose M, Endo T, Watanabe H. 2008. Distinct difference of *flaA* genotypes of *Legionella pneumophila* between isolates from bath water and cooling tower water. *Microbiol Immunol* 52(9):460-464.
- 2) Chang B, Sugiyama K, Taguri T, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H. 2009. Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(1): 147-53.
- 3) 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. *Jpn J Infect Dis.* 62(1): 54-6.
- 4) Kuroki T, Ishihara T, Ito K, Kura F. 2009. Bathwater-associated cases of legionellosis in Japan, with a special focus on *Legionella* concentrations in water. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62(3):201- 5.

- 5) Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura K, Iwanaga S, Koyama Y, Kura F, Noami M, Kusaka K, Funato T, Takeda M, Okumiya K, Kato N, Yamaguchi K. 2009. Is driving a car a risk for Legionnaires disease? *Epidemiol. Infect.* 137(11):1615-22.
 - 6) Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura K, Iwanaga S, Kouyama Y, Kura F, Kato N, Matsubayashi K, Okumiya K, Yamaguchi K. 2009. *Legionella pneumophila* in rainwater on roads. *Emerg. Infect. Dis.* 15(8):1295-7.
 - 7) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Jürgen H. Helbig, Bin Chang, Akiko 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).
 - 8) Chang B, Taguri T, Sugiyama K, Amemura-Maekawa J, Kura F, and Watanabe H: Comparison of the ability of ethidium monoazide and propidium monoazide for selective detection of viable *Legionella* cells, *Jpn. J. Infect. Dis.* (in press).
 - 9) 烏谷竜哉, 黒木俊郎, 大谷勝実, 山口誠一, 佐々木美江, 齊藤志保子, 藤田雅弘, 杉山寛治, 中嶋洋, 村上光一, 田栗利紹, 藏元強, 倉文明, 八木田健司, 泉山信司, 前川純子, 山崎利雄, 縣邦雄, 井上博雄. 2009. 掛け流し式温泉におけるレジオネラ属菌汚染とリスク因子. *感染症学会誌* 83(1):36-44.
 - 10) 森本 洋. 2010. 分離集落の特徴を利用したレジオネラ属菌分別法の有用性. *日本環境感染学会誌* 25 (1):8-14.
2. 書籍刊行
 - 1) 縣 邦雄, 泉山信司, 市川憲良, 遠藤卓郎, 大高道也, 小川正晃, 倉 文明, 後藤 元, 舘田一博, 中島博志, 中村 勉, 古畑勝則, 蓑島 稔, 柳 宇, 山口恵三, 山崎 和生. 第3版 レジオネラ症防止指針. 財団法人 ビル管理センター. 東京. 2009年3月.
 3. 総説、報告
 - 1) レジオネラ症 2003.1~2008.9. 病原微生物検出情報. 29:327-328. 2008.
 - 2) 木股裕子, 南出正之, 貫名正文, 常 彬, 前川純子. 2008年1月、神戸市における公衆浴場でのレジオネラ症集団発生事例. 病原微生物検出情報. 29:329-330. 2008.
 - 3) 中嶋 洋, 狩屋英明, 大島律子, 小林正和, 岩藤弘子, 後藤幸子, 浜 裕志, 野山幸子, 難波 勉, 阿部孝一郎. 老人福祉施設におけるレジオネラ集団感染事例ー岡山県. 病原微生物検出情報. 29:330-321. 2008.
 - 4) 前川純子, 倉 文明, 金子紀子, 渡辺祐子, 磯部順子, 貫名正文, 中嶋 洋, 河野喜美子, 多田有希. レジオネラ臨床分離株の収集と型別から得られた知見. 病原微生物検出情報. 29:332-323. 2008.
 - 5) 常 彬, 前川純子, 渡辺治雄. レジオネラを解析するパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法の改良. 病原微生物検出情報. 29:333-324. 2008.
 - 6) 倉 文明: *Legionella pneumophila*、最新細菌・カビ・酵母図鑑 (高鳥浩介、五十君静信監修)、71-74、技術情報協会、東京、2008年12月27日.
 4. 学会発表
 - 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.
 - 5) 前川純子. レジオネラの検査法と分子疫学. シンポジウム講演、衛生微生物技術協議会、第28回研究会、岡山、2007年7月.
 - 6) 倉 文明：温泉施設におけるレジオネラ感染予防のための適切な衛生管理手法 レジオネラ属菌の管理基準、感染事例と菌濃度との関連、および分子疫学、招請講演、行政研修フォーラム、公衆衛生学会、2007年10月、松山.
 - 7) 黒木俊郎：温泉施設におけるレジオネラ感染予防のための適切な衛生管理手法 掛け流し式温泉施設の衛生管理、招請講演、行政研修フォーラム、公衆衛生学会、2007年10月、松山.
 - 8) 荒井桂子、堀切佳代、田中礼子、吉川循江：遺伝子を利用したレジオネラ属菌検査の実試料への応用 LAMP 法と定量リアルタイム PCR 法. 第53回神奈川県公衆衛生学会、2007年11月、横浜.
 - 9) 郡山洋一郎、中村由美子、青木眞里子、柴早苗、高橋朝子、鈴木龍雄、工藤寛子、前川純子、倉文明：足立区における温泉水からのレジオネラ属菌検出事例について、第20回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌部会、2008年2月、千葉.
 - 10) 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：掛け流し式温泉の温泉成分検査、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、2008年3月、京都.
 - 11) Kura F, Amemura-Maekawa J, Yamazaki T, Endo T, Watanabe H, Morimoto Y, Iwabuchi K, Kumada H, Fujita M, Kuroki, T, Sugiyama K, Niikawa A, Hara N, Saishu N, Ogata, K, and Agata K. Surveillance of *Legionella* in hot springs with physicochemical and microbiological water quality parameters. 23rd Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Madrid, Spain. May 2008.
 - 12) Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Watanabe H, and Helbig JH. Sequence based typing and monoclonal antibody typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in Japan. 23rd Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Madrid, Spain. May 2008.
 - 13) Chang B, Honda N, Yoshida S-I, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H: Discrimination of viable and dead *Legionella* by photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR combination. XII International Congress of Bacteriology and

- Applied Microbiology. Istanbul. August 2008.
- 14) 渡辺祐子, 高橋智恵子, 大屋日登美, 岡崎則男: VNTR 法を利用した *Legionella pneumophila* の遺伝子型別. 第 82 回日本感染症学会総会. 2008 年 4 月, 島根.
 - 15) 黒木俊郎, 伊東久美子, 石原ともえ, 倉文明: 入浴施設に関連したレジオネラ症発生時の浴槽水の菌濃度調査. 第 82 回日本感染症学会総会. 2008 年 4 月, 島根.
 - 16) 森本 洋, 清水俊一, 池田徹也, 山口敬治: レジオネラ選択分離生培地の違いが検査結果に影響を与えるか? 第 60 回北海道公衆衛生学会, 2008 年 11 月, 札幌.
 - 17) 荒井桂子, 吉川循江, 田中礼子, 堀切佳代, 北爪稔, 山口正, 日高利夫: 高齢者福祉施設の水系設備におけるレジオネラ属菌の検出状況. 第 24 回日本環境感染学総会. 2009 年 2 月, 横浜.
 - 18) 倉 文明: 浴槽水環境におけるレジオネラの増殖リスクおよび必要とされる迅速検査. ワークショップ「環境改変と感染症」. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月, 名古屋.
 - 19) 前川純子, 倉 文明, 常 彬, 市瀬正之, 渡辺治雄: *Legionella pneumophila* 血清群 1 分離株の遺伝子型別およびモノクローナル抗体型別. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月, 名古屋.
 - 20) 常 彬, 前川純子, 渡辺治雄: レジオネラ解析用パルスフィールドゲル電気泳動法の改良. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月, 名古屋.
 - 21) 前川純子: レジオネラの検査法の進歩. ワークショップ「レジオネラの細菌学」. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月, 名古屋.
 - 22) Chang B, Taguri T, Sugiyama K, Amemura-Maekawa J, Kura F, and Watanabe H. 2009. Detection and quantification of viable *Legionella* cells from environmental water samples by combined use of ethidium monoazide and real-time PCR. The 7th International Conference, *Legionella* 2009, Paris.
 - 23) Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko N, Watanabe Y, Isobe J, Nukina M, Nakajima H, Kawano K, Tada Y, and Watanabe H: DistribuMon of serogroups, sequence types, and monoclonal antibody subgroups among *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan. LEGIONELLA 2009. Paris. October 2009.
 - 24) Kura F, Amemura-Maekawa J, Chang B, Suzuki-Hashimoto A, Ichinose M, Endo T, Watanabe H: Two groups of *Legionella anisa* isolates of environmental origin in Japan. LEGIONELLA 2009. Paris. October 2009.
 - 25) Taguri T, Oda Y, Sugiyama K, Izumiyama S, Kura F: Using flow cytometry to monitor the risk of legionellosis in bath water. LEGIONELLA 2009. Paris. October 2009.
 - 26) 泉山信司, 倉 文明, 遠藤卓郎: 遺伝子検査による *Legionella* 属菌の定量. 第 60 回全国水道研究発表会. 2009 年 5 月, 大宮市.
 - 27) 神田隆, 高橋奈緒美, 杉山寛治, 泉山信司, 倉文明, 遠藤卓郎: 市販 DNA 抽出キットを用いたレジオネラ核酸検出法の検討. 日本防菌防黴学会第 36 回年次大会 2009 年 9 月, 豊中市.
 - 28) 荒井桂子, 堀切佳代, 田中礼子, 吉川循江, 北爪稔, 山口正: 免疫磁気ビーズ法を用いたレジオネラ属菌の分離法. 日本防菌防黴学会第 36 回年次大会. 2009 年 9 月, 大阪.
 - 29) 森本 洋, 清水俊一, 池田徹也, 山口敬治: レジオネラ属菌培養法の検討—分離培地と集落について—, 第 77 回日本細菌学会北海道支部学術総会, 札幌, 2009 年 9 月
 - 30) 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学術集会、2009 年 10 月、東京.
- 31) 山崎利雄、前川純子、杉山寛治、渡辺祐子、鈴木敦子、市瀬正之、倉 文明: DNA-DNA ハイブリダイゼーション法によるレジオネラ属菌の同定. 第 58 回日本感染症学会東日本地方学術集会、2009 年 10 月、東京.
- 32) 荒井桂子、吉川循江、田中礼子、堀切佳代、北爪稔、山口正: レジオネラ症患者発生時の緊急を要する浴場施設における試料採取等の研究. 第 55 回神奈川県公衆衛生学会、2009 年 10 月、横浜.
- 33) 森本 洋、清水俊一、池田徹也、山口敬治: レジオネラ属菌検査法の検討ー非選択分離培地の活用法と濃縮法の違いによる検査結果への影響ー, 第 61 回北海道公衆衛生学会、札幌、2009 年 11 月
- 34) 渡辺祐子、佐々木美江、磯部順子、田栗利紹、緒方喜久代、倉文明: レジオネラの外部精度管理に関する基礎的検討. 第 22 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会、2010 年 2 月、前橋.
- 35) 磯部 順子、中嶋 洋、渡辺 祐子、森本 洋、緒方 喜久代、常 彬、前川 純子、渡邊 治雄、倉 文明: 浴槽水からのレジオネラの単離および定量化における免疫磁気分離法の評価、第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月、横浜.
- 36) 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.
- 37) Bin Chang, Toshitsugu Taguri, Kanji Sugiyama, Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, and Haruo Watanabe : Specific detection of viable *Legionella* cells from environmental samples by real-time PCR. 第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月、横浜.
- 38) 山崎利雄、前川純子、杉山寛治、渡辺祐子、鈴木敦子、市瀬正之、倉文明、市販 DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) 法キットで同定できないレジオネラ属菌の同定、第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月、横浜.

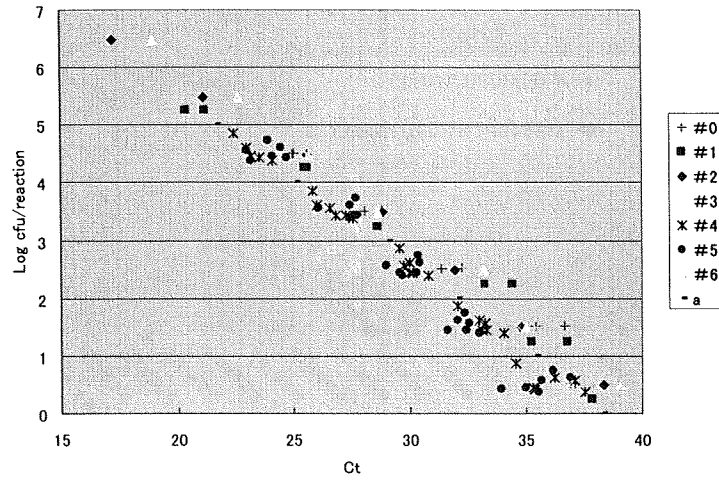


図1 感染 *Acanthamoeba* 由来レジオネラ (#0+, #1 ■) と BCYE α 培地上コロニー (#2 ほか) から作成した検量線

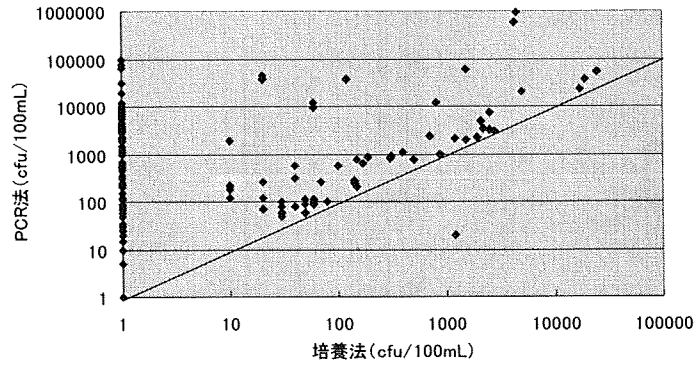


図2 PCR法と培養法の関連

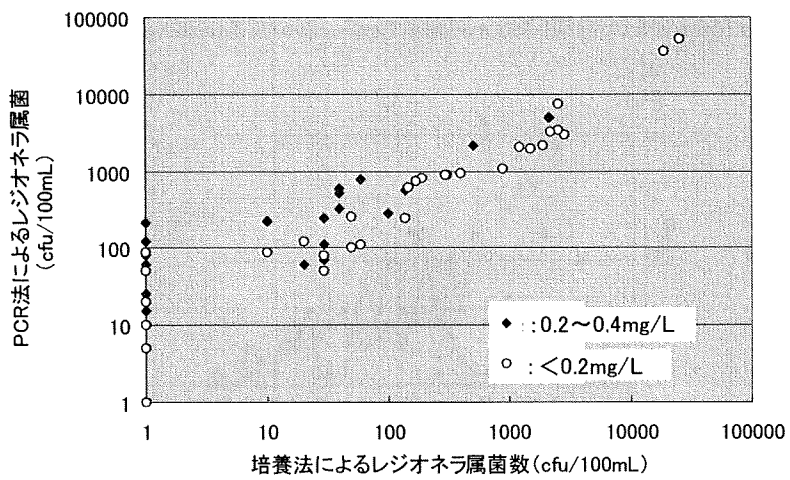


図3 遊離残留塩素 0.4 mg/L 以下の試料中のレジオネラ属菌数

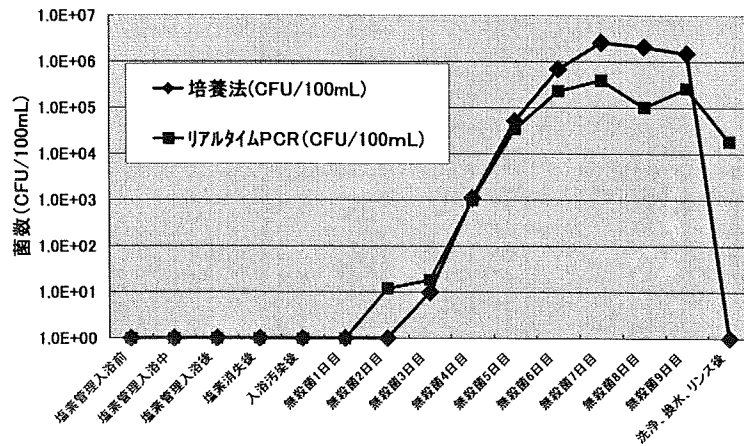


図4 モデル浴槽でのレジオネラ属菌数の推移

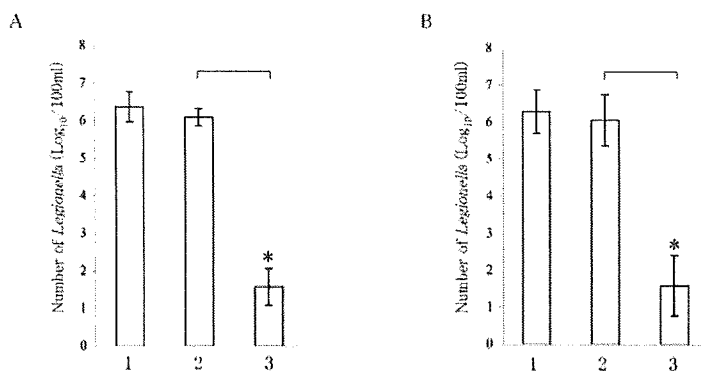


図5. レジオネラのモックサンプルにおける生菌のみの定量検出

A: *L. pneumophila* B: *L. bozemanii*

Bar 1: real number of viable *Legionella* cells determined by plating on the BCYE plates;

Bar 2: number of EMA-treated, viable *Legionella* cells determined by real-time PCR;

Bar 3: number of EMA-treated, chlorine-killed *Legionella* cells determined by real-time PCR. No viable cells of chlorine-killed *Legionella* cells were detected by plating on BCYE agar. Asterisks (*) indicate significant decrease in the number of the EMA-treated chlorine-killed *Legionella* cells determined by real-time PCR.

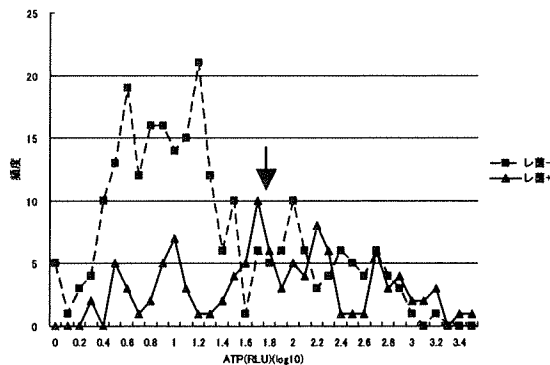


図6 ATP測定値におけるレジオネラ属菌検出・不検出検体数の頻度
レジオネラ属菌検出頻度平均値はRLU 1.7 (↓) 未満では18%、以上では56%。

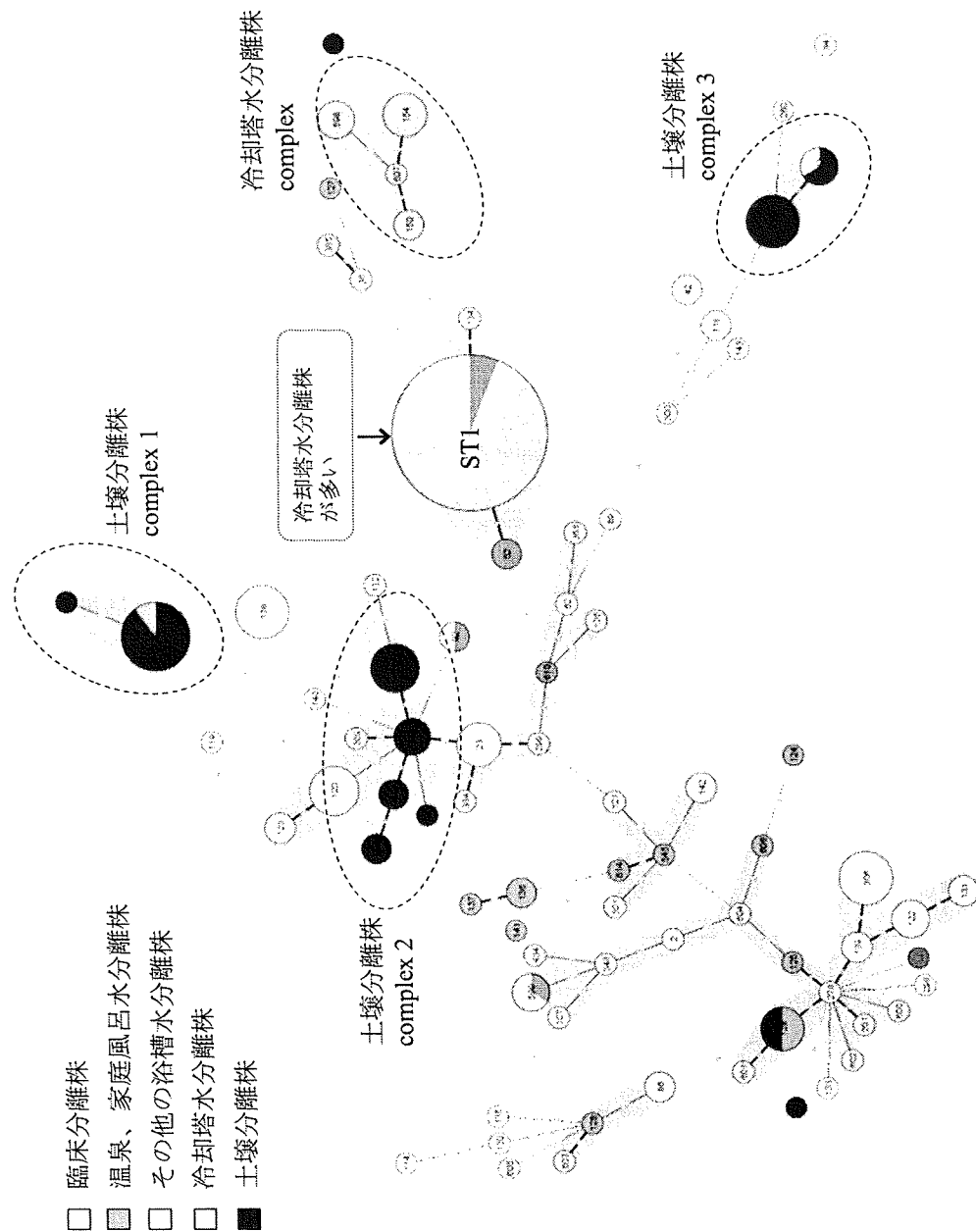


図7 Minimum spanning tree法による*L. pneumophila*分離株のST同士の類縁関係。

“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。円の大きさはそれぞれのSTを有する株数に比例している。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。冷却塔水分離株はほとんどがST1で、それ以外の5種類は1種類を除いて互いに似ておりcomplexを形成している。土壌分離株は、多い3種類はそれぞれ別々のcomplexに属し、残りの8種類のうち6種類はそれらのcomplexのいずれかに属する。浴槽水分離株および臨床分離株は多様である。

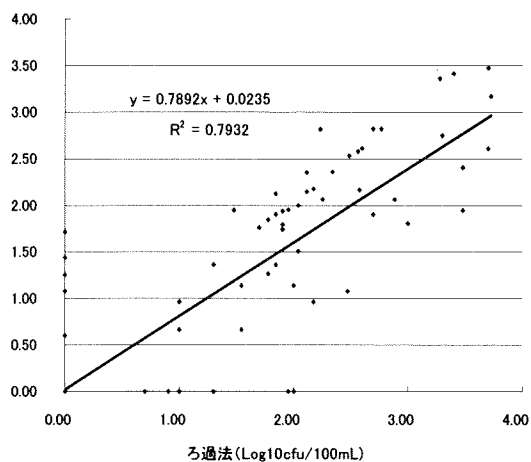


図8 免疫磁気分離法の評価 (191 検体)

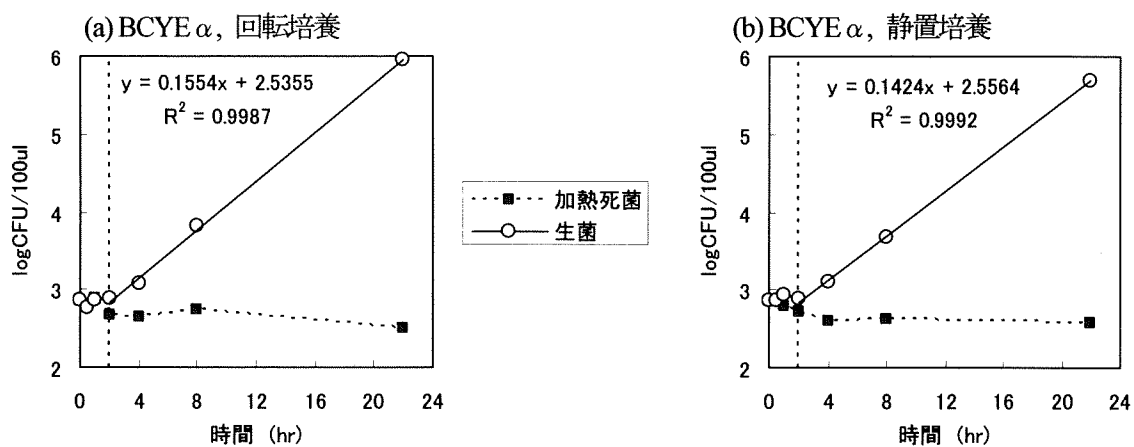


図9 LC qRT-PCR 法における rRNA の増幅 (BCYE α 液体培地)

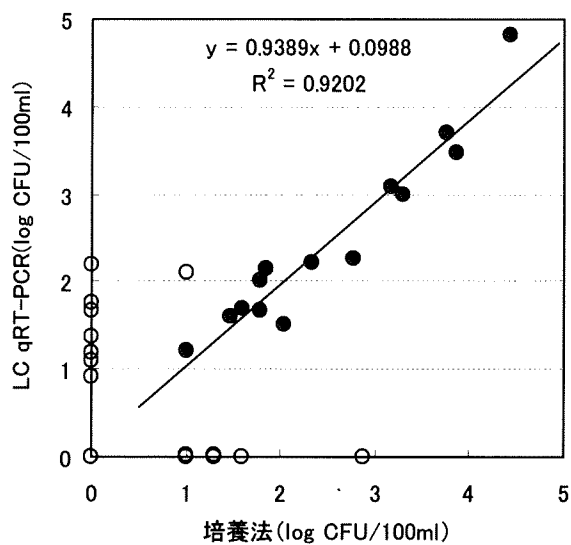


図10 培養法と LC qRT-PCR 法の相関

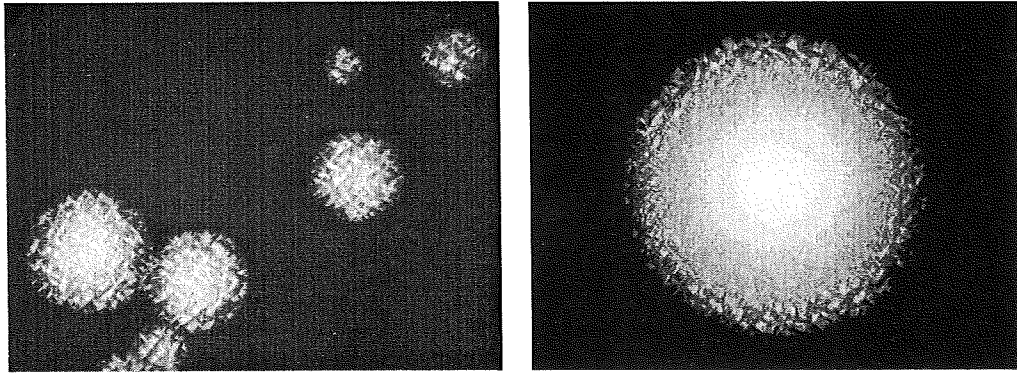


図 11 実体顕微鏡下のレジオネラ属菌集落 (BCYE α 生培地 : Oxoid)

(左) *L. pneumophila* GTC296 出現初日 集落の成長とともに模様も変化する (撮影倍率 \times 120)

(右) *L. pneumophila* GTC296 出現 2 日目 (撮影倍率 \times 124)

表 1 検査行程の組み合わせによる回収率

	試料 1		試料 2	
	ろ過法	遠心法	ろ過法	遠心法
酸処理	69.9(n=10)	13.4(n=10)	67.0(n=10)	10.4(n=10)
CV%	31.4	99.5	22.2	88.8
加熱処理	15.3(n=30)	9.1(n=10)	18.8(n=30)	14.8(n=10)
CV%	120.3	84.6	91.6	47.6

II. 資 料