

Table 2 雑菌処理と分離培地の検出感度 (n=56)

			未加熱	加熱
WYO	GVPC	MWY	15	16
WYO	GVPC			2
WYO		MWY	2	3
	GVPC	MWY	2	1
WYO			4	2
	GVPC			
		MWY	1	3
	計		24	27

10cfu/100m によらない(定性)

Table 2-1 雑菌処理と分離培地の検出感度 (n=56)

	未加熱	加熱
WYOα(市販品)	21	23
GVPC(市販品)	17	19
MWY(自家製)	20	23

10cfu/100m によらない(定性)

Table 3 浴槽水と湯口水の検出状況(n=27)

		浴槽水		計
		+	-	
湯口水	+	6	1	7
	-	10	10	20
	計	16	11	27

基準値 10cfu/100m 以上

Table 4 LAMP 法と培養法の比較

		LAMP		計
		+	-	
培養法	+	23	6*(3)	29
	-	11	16	27

*10cfu/100mlによらない(定性)
()は、定性検体数を再掲

サンプルB
2000cfu/100ml
L. pneumophila 3株
掛け流し
浴槽水
pH 5.8
含炭酸・ナトリウム・カルシウム・炭酸水素塩・塩化物泉
遊離残留塩素 なし

50cfu/100ml
L. pneumophila
掛け流し
浴槽水
pH 7.3
炭酸水素塩泉

50cfu/100ml
L. longbeachae
掛け流し
浴槽水
pH 5.1
ナトリウム-塩化物泉

遊離残留塩素 なし

遊離残留塩素 0.05

Table 5 抽出法の検討

	測定回数	LAMP 法測定結果 ^a	
LAMP 法添付試薬による抽出	1 回目	2/3	
	2 回目	0/3	
キレックスによる抽出	1 回目	1/3	^a 陽性回数/測定回数
	2 回目	2/3	
タカラ カラム抽出 ^b	1 回目	0/3	^b TaKaRa NucleoSpin Tissue
キアゲン カラム抽出 ^c	1 回目	0/3	^c QIAamp DNA Mini Kit

Fig. 1 アンケート調査

1 レジオネラ属菌の依頼検査についてお尋ねします。	
1)	依頼検査を実施していますか。
2)	検査する対象はどのような検体ですか。
3)	検査件数(年間)はどのくらいですか。
4)	実施している検査法の出典あるいは根拠とした方法は何ですか。
5)	依頼検査を実施していない理由についてお尋ねします。
6)	今後この検査を導入する予定についてお尋ねします。
2 検体の採水・搬入等についてお尋ねします。	
1)	検体はどのように採水・搬入されますか。
2)	採水容器はどのように準備していますか。
3)	採水した検体は残留塩素の不活化を実施していますか。
3 レジオネラ属菌の検査法についてお尋ねします。	
1)	検体はどのように濃縮しますか。
2)	雑菌を抑制するための処理を行いますか。
3)	培養法についてお尋ねします。
①	使用している培地を下記から選び、1 検体あたりに使用する枚数をご記入ください。(メーカー名・枚数)
②	培養期間はどのくらいですか。
③	斜光法(実体顕微鏡を用いた観察法)を実施していますか。
④	レジオネラ属菌の同定はどの方法ですか(複数選択可能)。
4 依頼者への報告内容はどのような内容としていますか。	
5 レジオネラの検査法に関する研修会等についてお尋ねします。	
1)	研修会が開催される場合受講をしますか。
2)	レジオネラ属菌についての精度管理を希望しますか。

Fig. 2 アンケート結果(抜粋)

3 レジオネラ属菌の検査法についてお尋ねします。(9)					
1)	検体はどのように濃縮しますか。	ろ過法 3	冷却遠心 6		
2)	雑菌を抑制するための処理を行いますか。	加熱 1	酸 7	未 1	
3)	培養法についてお尋ねします。				
	ウ)斜光法(実体顕微鏡を用いた観察法)を実施していますか。	知っている 4	聞いたことがある 1	知らない 3	
	エ) レジオネラ属菌の同定はどの方法ですか(複数選択可能)。	G染色 2	システイン要求性 7	馬尿酸 1	抗血清 1
5 レジオネラの検査法に関する研修会等についてお尋ねします。(12)					
1)	研修会が開催される場合受講をしますか。	受講 2	県内 5	北陸 3	しない 1 不必要 1
2)	レジオネラ属菌についての精度管理を希望しますか。	希望 7	希望 1	わからない 4	

平成23年度厚生労働科学研究(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
分担研究報告書

公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究

環境水の新規濃縮ろ過法の検討

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	大屋日登美	神奈川県衛生研究所微生物部
研究協力者	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所企画情報部

研究要旨：現在広く普及している検査法では、試料の濃縮に時間を要し、短時間に多くの試料を検査することを困難にしている。そこで、高い回収率を保ちつつ短時間での濃縮を可能にする検査法の改良を行う検討をした。これまでのろ過濃縮法の検討において、浴槽水試料ではハイドロキシアパタイトをろ材として用いると回収率の上昇がみられたが、基礎的検討として平板培養菌を用い、添加回収実験を行ったところ回収率の改善はみられなかった。そこで本研究では、自然環境に近い状態のアメーバ増殖レジオネラ属菌を用い、①アメーバを用いたレジオネラ増菌の再現性、②ろ過フィルターの材質・孔径による差、③ハイドロキシアパタイトの効果について検討したので報告する。

A. 研究目的

現在広く普及している検査法では、試料の濃縮に時間を要し、短時間に多くの試料を検査することを困難にしている。本研究は、高い回収率を保ちつつ短時間での濃縮を可能にする検査法の改良を行うことを目的とした。

で50倍に希釈した

1/50PBSにて550nmでOD値0.35に調整し、10倍段階希釈を行い希釈系列のうちコロニーが30~300カウントが可能になるように段階希釈し培地各3枚を用いてコロニーカウントを行った。

B. 研究方法

1. 添加菌数の調整

供試菌株として、当所保存分離株レジオネラ・ニューモフィラ Lp58-3 株（血清群1）を使用した。培地は、BCYE- α 培地（日研生物化学研究所）とGVPC- α 培地（日研生物化学研究所）を用いた。培養条件は30℃、4日間として平板培地で培養後、1/15mol Phosphate Buffer Powder リン酸緩衝剤（組成1L中：Na₂HPO₄ 5.7g, KH₂PO₄ 3.6g、和光純薬工業株式会社）、pH7.0を作製後、滅菌蒸留水

2. アメーバを用いたレジオネラ増菌

平板培養菌を用いたところ、ろ過後の菌数カウントに大きなばらつきが生じたことから、自然環境に近い状態のレジオネラを用いる過濃縮実験を行った。

アメーバは、*Acanthamoeba*/JACE1（国立感染症研究所より分与）を30℃、4日間PYGC液体培地で培養した。この培養液を1/50PBSに置き換え、レジオネラLp53-7の新鮮培養菌を10³CFU/mLとなるように添加して30℃で7日間培養し、アメーバを孔径5 μ mの滅菌セルロースア

セテートメンブランフィルターで除去したものについて各 100 μ l ずつ、段階希釈後、各 3 枚の GVPC- α 培地を用いてレジオネラ菌数をカウントし、アメーバを用いたレジオネラ増菌状況を調べた。

3. ろ過フィルターの種類と孔径

アメーバ増菌レジオネラを用いる過濃縮法において、メンブランフィルター (MF) の材質と孔径が回収率に及ぼす影響を調べた。フィルターは径 47mm、6 種類 (ポリカーボネート 0.2 μ m および 0.4 μ m、セルロースアセテート 0.2 μ m および 0.45 μ m、混合セルロースエステル 0.2 μ m および 0.45 μ m、ADVANTEC) を用い、ろ過濃縮実験を行った。

1/50PBS で作製した試料 1000mL に、上記 2. でアメーバ増菌したレジオネラを 10^3 CFU 添加した。これを 500mL ずつ 2 本に分けて吸引ろ過を行い、50mL 遠沈管に PBS5mL とろ過を行ったフィルターを入れ、ボルテックスで 1 分攪拌後、手振りで再浮遊させた。原液と 10 倍希釈を 100 μ l、各々 3 枚の GVPC- α 培地に接種した。

4. ろ材を用いた検討

ろ過フィルターの孔径を小さくすると回収率は高くなるが試料の濃縮に時間を要するという課題がある。そこで、ハイドロキシアパタイト (AP20C)、捕捉ビーズ (オンサイトレジオネラキット、ジェネティン (株) および珪藻土をろ材として、濃縮時間を短縮しつつ回収率を向上させる検討を行った。メンブランフィルターは、ポリカーボネート孔径 0.2 μ m、セルロースアセテート孔径 0.2 μ m および 0.45 μ m (ADVANTEC) を用いた。各フィルターにハイドロキシアパタイト (AP20C) を 0.4、0.8g 添加し、ろ過

濃縮を行った。捕捉ビーズについては、0.2、0.4、0.8g を添加した。

なお、捕捉ビーズについては 0.45 μ m セルロースアセテート MF を用いて径 25mm および 47mm で比較した。珪藻土については、0.45 μ m セルロースアセテート MF を用い 0.4g を添加し、レジオネラ添加試料 (500mL、2 本) をろ過濃縮した。

C. 結果と考察

1. 添加菌数の調整

ろ過濃縮法の検討において、添加菌数の調整が不可欠であるが、レジオネラ属菌の生菌数の測定は他の細菌に比較するとバラツキが大きい。

そこでレジオネラ属菌について、グラム染色で形態が一樣であることが確認できた培養条件である 30 $^{\circ}$ C、4 日間で培養し 550nm で OD 値 0.35 になるように条件をそろえて菌液を調整したところ、菌数に 10^7 CFU/mL から 10^8 CFU/mL と相違が生じた。

2. アメーバを用いたレジオネラ増菌

今年度の検討においてもアメーバによってレジオネラ属菌を 1000 倍増菌することが可能になった。アメーバ増菌を行うことにより安定した菌数 (260~840 CFU/100mL) を接種することが可能になった (表 1)。

しかしながら、アメーバで増菌した場合は、菌数を調整する際の OD 値は、0.0014~0.173 とバラツキが生じたため、実験前の OD 値による菌数調整は困難であった。そこでリアルタイム PCR を利用した菌数測定の場合は、当日に添加菌数を測定できる RT-PCR 法を検討中である。

こうした原虫を用いたレジオネラ増菌については既に報告があるが¹⁾、35 $^{\circ}$ C で 7 日間培養し、接種菌量を 10^3 CFU/mL

とした場合、菌数が 10^6 CFU/mL に増菌しており、また、*Acanthamoeba* を用いたレジオネラ増菌を行った報告²⁾においても培養条件に相違はあるが、本研究における *Acanthamoeba* を用いた増菌と同様の傾向がみられた。

3. ろ過フィルターの種類と孔径

アメーバで増菌したレジオネラを用い、フィルターの材質と孔径が回収率に及ぼす影響を調べた(表1)。その結果、孔径 $0.2\mu\text{m}$ ポリカーボネート MF が最も回収率がよいことがわかった。他に比べ混合セルロースエステル MF の回収率は、今回の検討でも低いことが示された。

また、フィルターの材質・孔径で回収率に差があることが示された(図1)。

メンブランフィルターの材質と孔径の検討については、ポリカーボネート MF が最もよく、孔径 $0.4\mu\text{m}$ よりも $0.2\mu\text{m}$ のほうが高い回収率になるという報告³⁾があり、本研究の結果と一致した。

また、小さいサイズのレジオネラ属菌は、 $0.65\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでは一部通ったが、 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターを通りぬけないという報告⁴⁾がある。今後、孔径によって回収率に差が生じた原因について検討することが必要と考える。

4. ろ材を用いた検討

濃縮時間が短時間でも回収率を上げることが目的として、孔径 $0.45\mu\text{m}$ セルロースアセテート MF または $0.4\mu\text{m}$ ポリカーボネート MF の回収率をろ材を用いることで $0.2\mu\text{m}$ ポリカーボネート MF の回収率と同程度に上げることが可能であるか否かを検討した。

孔径 $0.45\mu\text{m}$ のろ過フィルターにろ材としてハイドロキシアパタイト (AP12C)

を添加することにより、孔径 $0.2\mu\text{m}$ のろ過フィルターに比べろ過速度を上げつつ、回収率を上げることが期待されたが、これまでの検討ではろ材添加によって回収率の改善はみられなかった。

そこで、今年度は珪藻土と補足ビーズをハイドロキシアパタイトの代わりに添加したところ、ハイドロキシアパタイト (AP12C) より回収率が高くなったが、ろ材を添加しない場合よりも回収率が低下した(表2)。また、メンブランフィルターの径を小さくすることにより、回収率の改善を試みた。径が 47mm より 25mm のメンブランフィルターでやや回収率が改善されたが、補足ビーズを添加することによる効果は得られなかった(表3)。

ハイドロキシアパタイト AP12C に替えてさらに粒子の小さいハイドロキシアパタイト AP20C と孔径 $0.4\mu\text{m}$ ポリカーボネート MF で同様に検討した(表4)。AP20C を 0.8g 添加した時に、孔径 $0.4\mu\text{m}$ の MF フィルターで孔径 $0.2\mu\text{m}$ ポリカーボネート MF よりも高い回収率となった。

同時に同量の試料をろ過したところ、同じ材質のポリカーボネート MF で孔径 $0.2\mu\text{m}$ と $0.4\mu\text{m}$ では、明らかに $0.4\mu\text{m}$ MF でろ過速度が早かった。ろ材を添加してもろ過速度は、孔径 $0.2\mu\text{m}$ MF より $0.4\mu\text{m}$ MF のほうが早くろ過できた。

これまでの検討で、孔径 $0.4\mu\text{m}$ ポリカーボネート MF と $0.45\mu\text{m}$ セルロースアセテート MF の回収率が同程度であったため、まず、回収率が最もよかった孔径 $0.2\mu\text{m}$ ポリカーボネート MF に回収率を近づけるため、ろ材の粒径をこれまでより小さくしハイドロキシアパタイト AP20C の効果を調べたところ、孔径 $0.4\mu\text{m}$ ポリカーボネート MF でろ過速度を向上させ、回収率に改善がみられた。

今後は、今回の結果について再現性確認を行い、ろ過速度をより早くするため、孔径 0.45 μm セルロースアセテート MF とヒドロキシアパタイト AP20C を用い、回収率の改善を図る予定である。

D. 結論

今年度の検討により、来年度以降の課題として以下の3点が挙げられる。

1. ろ材（ヒドロキシアパタイト及び捕捉ビーズ）の効果の検討には、粒子を小さくする、ろ過フィルターの径を小さくし、孔径を 0.45 μm にする等を行い、再度検討する。
2. アメーバ増菌での菌数調整は OD 値では困難であるため、リアルタイム PCR で迅速に菌数調整を行う。
3. 実際の試料でろ過フィルターの種類と孔径の組み合わせによる回収率の検討を行う。

E. 参考文献

- 1) Fields BS, Shotts EB Jr, Feeley JC, Gorman GW, Martin WT., Proliferation of *Legionella pneumophila* as an

intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. Appl Environ Microbiol. 1984;47(3):467-71.

2) Holden EP, Winkler HH, Wood DO, Leinbach ED. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba castellanii* Neff. Infect Immun. 1984;45(1):18-24.

3) Smith L, Carroll K, Mottice S. Comparison of membrane filters for recovery of legionellae from water samples. Appl Environ Microbiol. 1993;59(1):344-6.

4) Orrison LH, Cherry WB, Milan D. Isolation of *Legionella pneumophila* from cooling tower water by filtration. Appl Environ Microbiol. 1981;41(5):1202-5.

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

表1 アメーバ増菌培養菌を用いたろ過フィルターの検討結果

No.	メンブランフィルター*	孔径 (μm)	添加回収									
			CFU/100mL (%)		CFU/100mL (%)		CFU/100mL (%)		CFU/100mL (%)			
			260	(100)	340	(100)	280	(100)	840	(100)	280	(100)
1	ポリカーボネート	0.20	370	(142.3)	290	(85.3)	300	(107.1)	640	(76.2)	260	(92.9)
2	ポリカーボネート	0.40	180	(69.2)	190	(55.9)	**ND		**ND		180	(64.3)
3	セルロースアセテート	0.20	210	(80.8)	230	(67.6)	360	(128.6)	320	(38.1)	**ND	
4	セルロースアセテート	0.45	170	(65.4)	170	(50.0)	210	(75.0)	240	(28.6)	170	(60.7)
5	混合セルロースエステル	0.20	140	(53.8)	130	(38.2)	**ND		**ND		**ND	
6	混合セルロースエステル	0.40	180	(69.2)	110	(32.4)	**ND		**ND		**ND	

* No.1-5: ADVANTEC, No.6: MILIPORE

(検水量: 500mL \times 2, GVPC α 培地使用)

** ND: not done

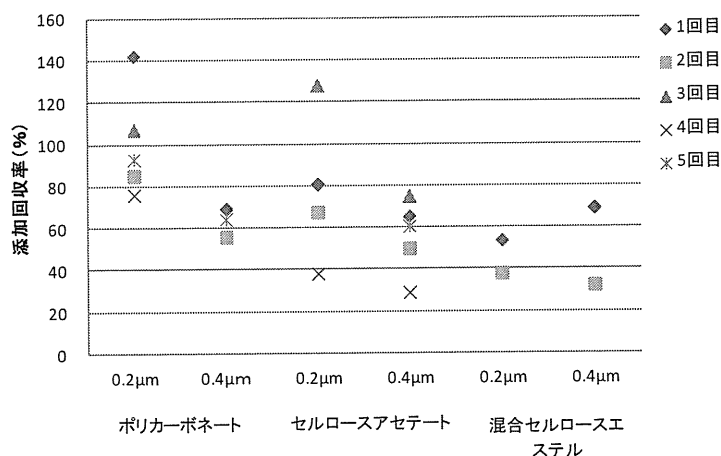


図1 ろ過フィルターの材質・孔径による回収率

(GVPC α 培地使用、アメーバ除去:5 μ mフィルター使用)

表2 アメーバ増菌培養菌を用いた珪藻土および捕捉ビーズの効果

No.	ろ材	添加量(g)	添加菌数 CFU/100mL	回収菌数 CFU/100mL	回収率 (%)
1	珪藻土	0.4	330	63	(19.1)
2	捕捉ビーズ	0.2	280	170	(60.7)
3	捕捉ビーズ	0.4	280	92	(32.9)
4	捕捉ビーズ	0.8	280	11	(3.9)

(セルロースアセテート: 孔径0.45 μ m、検水量:500mL \times 2、GVPC α 培地使用)

表3 アメーバ増菌培養菌を用いた捕捉ビーズの検討

No.	ろ過条件	孔径 (μ m)	フィルター径	回収菌数 (CFU/100mL)	回収率 (%)
1	セルロースアセテート*	0.45	47mm	61	(7.3)
2	セルロースアセテート	0.45	25mm	220	(26.2)

* ADVANTEC

(ビーズ:0.2g添加、添加菌数840CFU/100mL、検水量:500mL \times 2、GVPC α 培地使用)

表4 アメーバ増菌培養菌を用いたハイドロキシアパタイトの効果

No.	フィルター*		ろ材		回収菌数 CFU/100mL	回収率 (%)
	材質	孔径(μ m)	種類	添加量(g)		
1	ポリカーボネート	0.2			260	(92.9)
2	ポリカーボネート	0.4			150	(53.6)
3	ポリカーボネート	0.4	AP-20C**	0.4	175	(62.5)
4	ポリカーボネート	0.4	AP-20C	0.8	280	(100.0)

* ADVANTEC、径47mm

**積水化成品工業(株)

(添加菌数280CFU/100mL、検水量:500mL \times 2、GVPC α 培地使用)

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）
分担研究報告書

公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた
総合的衛生管理手法に関する研究
Legionella pneumophila の SBT 法による遺伝子型別

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

研究要旨： レジオネラ症患者に由来する臨床分離株を収集して、*Legionella pneumophila* については、SBT (sequence-based typing) 法を用いて遺伝子型別を行った。2010 年度に収集された臨床分離株は 43 株で、42 株が *Legionella pneumophila* で、血清群 1 が 35 株、血清群 3、5、6 が各 2 株、血清群 10 が 1 株だった。残りの 1 株は *Legionella londiniensis* だった。*L. londiniensis* の臨床分離例は初めてである。今まで調べられていない環境水として、噴水などの修景水やシャワー水、加湿器等から分離された *L. pneumophila* 血清群 1 の 15 株についても遺伝子型別を行った。臨床分離株は血清群 5 の 1 株と、血清群 10 の株は 1 つの遺伝子が PCR により増幅せず、遺伝子型が決まらなかった。残りの 41 株は 27 種類の遺伝子型に分けられた。ST (sequence type) 1 が 4 株と最も多かった。環境由来株は 11 株が ST1 で、以前から調査されている冷却塔水由来株と似た傾向を示し、温泉水由来株の傾向とは異なっていた。残り 4 株は 4 種類の遺伝子型に分かれたが、1 種類の新規遺伝子型を除いて臨床分離例のある遺伝子型で、それらの環境水もレジオネラ症の感染源として注意が必要であることが示された。

A. 研究目的

公衆浴場等の入浴施設において衛生管理が不適切な場合、レジオネラ症例が発生することがある。その際、感染源を確定するにはレジオネラ症患者からの分離株と環境からの分離株の遺伝子型を比較し、同一菌株であるかどうかを確認しなければならない。その有効性を調べるために、レジオネラ症の起因菌として最も

多い *Legionella pneumophila* の臨床分離株、環境分離株について遺伝子型別を行っている。それにより、臨床分離株に多く見られる病原性が高いと考えられる遺伝子型の存在や、異なる環境により遺伝子型の分布が異なり、臨床分離株の遺伝子型から、感染源が推測できる可能性があることも明らかになってきた。今年度も収集した臨床分離株について、遺伝子型別

を行った。また、今まで明らかになっていない感染源を探るため、今年度は、修景水などの環境水からの *L. pneumophila* 血清群 1 について遺伝子型別を行い、情報を得た。

B. 研究方法

1 臨床分離株

昨年度（2010 年度）にレジオネラ・レファレンスセンターで収集したレジオネラ臨床分離株 43 株（実際の分離年は 2006 年 1 月から 2011 年 2 月）についてデンカ生研のレジオネラ免疫血清を用いて血清群別を行い、*Legionella pneumophila* については 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-acetylneuraminic acid cytidylyltransferase) 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。

2 環境分離株

2001 年から 2007 年位採取された公園の噴水などの修景水由来の *L. pneumophila* 血清群 1 の 11 株について SBT を行った。その他に、シャワー水由来 3 株、河川水（水道原水）由来 1 株の *L. pneumophila* 血清群 1 を収集し、遺伝子型別を行った。

C. 研究結果

臨床分離株 43 株の内訳は *L. pneumophila* 血清群 1 が 35 株、血清群 3、5、6 が各 2 株、血清群 10 が 1 株、*Legionella londiniensis* が 1 株で、すべて独立の事例である。*L. londiniensis* がヒトから分離されたという報告は今回が初めてである。昨年度の解析で 4 例と複数見られた ST23 が今年度も 3 株見出されたが、2006 年、2009 年の事例のものがあり、2010 年度の事例は 1 例だった。また、2000 年以前に多く、それ以降は 2008 年に 1 例のみだった ST1 が、2010 年度は 4 株収集され、そのうち 3 例は 2010 年度の事例だった。ほとんどが温泉感染事例と考えられる ST138 は 2010 年度も複数株分離された。国内臨床分離例で多い ST120、国内固有遺伝子型の ST384 も複数株収集された。同一県内で分離されている ST93（血清群 3）は 2010 年度に 4 例目、5 例目が分離された。国内固有遺伝子型の ST876 も 2 株

収集された他は、1株ずつの遺伝子型であった。血清群5の1株と、血清群10の株は *neuA* 遺伝子がPCRにより増幅せず、遺伝子型が決まらなかった。残りの41株は27種類の遺伝子型に分けられた。新規遺伝子型は7つあり、EWGLIのデータベースに登録され、ST番号が付与された(表1)。

環境分離株の *L. pneumophila* 血清群 1

(噴水を含めた修景水由来株 11株、公衆浴場シャワー水由来株 3株、水道原水である河川水由来株 1株の計 15株)の遺伝子型別の結果を表2に示した。ST1が11株(73%)を占め、残りの4株の遺伝子型はそれぞれ異なっていた。1つの新規遺伝子型以外は臨床分離株での報告例のある遺伝子型だった。

表1 2009年度に収集した臨床分離株(43株)

NIIB 番号	分離 年	性別	感染源(推定、と記載していない場合は環 境分離株とPFGE一致)	種名	血清 群	ST (Sequence Type)	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>	同じSTの報告があるか(2012年 2月現在)
2642	2006	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外
2646	2010	女	院内感染(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外
2685	2010	男	院内感染(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外
2727	2010	女	不明(調査実施するも水系感染の疑いなし)	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	国内11例目、国外
2630	2010	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	507	2	3	5	10	2	1	6	国内3例目
2615	2010	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	国内外
2623	2008	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	国内外
2683	2010	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	国内外
2733	2010	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	国内12例目、国外
2731	2010	男	砂が貯留した船底の修理(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	973	2	3	5	15	2	1	6	無
2624	2008	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	876	2	3	6	15	51	1	6	無一国内
2638	2010	男	不明(塗装業)	<i>L. pneumophila</i>	1	876	2	3	6	15	51	1	6	国内2例目
2628	2009	男	足湯(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	国内外
2639	2006	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	国内9例目、国外
2743	2011	女	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	国内10例目、国外
2643	2007	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	384	2	3	9	10	2	1	10	国内5例目
2684	2010	男	不明(千葉、東京、大阪、札幌に滞在)	<i>L. pneumophila</i>	1	384	2	3	9	10	2	1	10	国内6例目
2730	2009	男	浴槽水(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	384	2	3	9	10	2	1	10	国内7例目
2625	2008	男	塵埃感染(推定、エアコン)	<i>L. pneumophila</i>	1	905	2	3	9	13	56	5	6	無
2640	2006	男	仕事環境(推定、土木作業員)	<i>L. pneumophila</i>	1	891	2	3	18	13	2	5	6	国外1例
2632	2010	男	浴槽水(推定、老人施設)	<i>L. pneumophila</i>	1	882	2	10	3	21	9	14	9	無
2648	2009	男	公衆浴場シャワー水	<i>L. pneumophila</i>	1	954	3	6	1	10	14	11	6	無
2614	2010	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	609	3	13	1	1	14	9	1	国内4例目、国外1
2610	2010	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	42	4	7	11	3	11	12	9	国内5例目、国外
2616	2009	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	129	6	6	15	28	4	14	11	国内外環境のみ臨床分離株初
2613	2010	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	763	6	10	19	28	19	4	11	国外1例
2611	2010	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	644	6	10	20	10	9	14	11	国内2例目
2627	2008	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	566	6	10	20	13	21	14	11	国内2例目
2631	2010	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	59	7	6	17	3	13	11	11	国外多、国内2例目
2629	2009	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	353	8	10	6	15	51	1	6	国内4例目
2728	2010	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	国内10例目
2732	2010	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	国内11例目
2641	2006	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	739	12	8	11	2	10	12	2	国内土壌のみ臨床分離株初
2617	2009	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	288	12	8	11	16	29	12	2	国外1例
2644	2008	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	947	23	10	15	21	30	14	9	無
2609	2010	女	不明	<i>L. pneumophila</i>	3	93	3	10	1	28	14	9	13	国外10例、国内同一県内
2637	2010	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	3	93	3	10	1	28	14	9	13	国外多、同一県内5例目
2647	2010	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	5	1032	3	13	1	6	14	9	38	無
2682	2010	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	5	-	8	6	34	9	53	8	NA	国外
2645	2008	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	6	242	3	10	1	28	1	9	3	国外1例
2634	2010	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	6	537	3	13	1	28	12	9	3	国内2例目
2651	2010	男	旅行(推定、出張)	<i>L. pneumophila</i>	10	-	3	4	1	28	14	9	NA	無
2735	2011	男	温泉(推定、溺水)	<i>L. londiniensis</i>										

表 2 *L. pneumophila* 血清群1環境分離株の遺伝子型別(15株)

NIIB番号	由来	由来	分離日ある い搬入日	ST	flaA	pilE	asd	mip	mompS	proA	neuA	ST備考
NIIB2766	噴水	福岡市	2001/8/13	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2767	噴水	福岡市	2001/8/14	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2769	修景水	福岡市	2003/3/5	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2770	修景水	福岡市	2003/3/5	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2771	修景水	福岡市	2003/3/19	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2772	修景水	福岡市	2003/3/19	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2773	修景水	福岡市	2003/8/6	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2774	修景水	福岡市	2003/8/13	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2768	噴水	福岡市	2001/8/15	876	2	3	6	15	51	1	6	国内臨床2株
NIIB2753	噴水	宮崎県	2004/4/12	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2725	修景水	新潟市	2007/8/27	493	3	13	1	28	14	9	11	国外で臨床2、環境1
NIIB2833	公衆浴場シャワー水	荒川区	2011/11/9	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数
NIIB2823	公衆浴場シャワー水	荒川区	2011/10/18	1144	2	10	15	12	9	14	11	新規
NIIB2649	公衆浴場シャワー水	文京区	2009/10/29	954	3	6	1	10	14	11	6	新規(感染源として臨床分離株と一致)
NIIB2841	河川水(水道原水)	神奈川県		1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床・環境株多数

D. 考察

臨床分離株の内訳から、レジオネラ症のおよそ2割の起因菌は *L. pneumophila* 血清群1以外だった。この傾向は昨年度と同様であった。レジオネラ症の確定診断の95%以上を占める尿中抗原検査では、*L. pneumophila* 血清群1が起因菌でない場合は、ほとんど陰性となるので、菌分離が行われなければ、これらの事例はレジオネラ症と確定できなかった。2011年10月にLAMP法によるレジオネラ核酸同定検査が保険適用となり、迅速診断法として普及すると思われる。LAMP法では *L. pneumophila* 血清群1以外のレジオネラ属菌も検出可能なので、見逃されていた症例が診断されるようになることが期待される。しかしその一方で、菌が分離されなければ、感染源の特定も困難であり、起因菌の疫学情報を得るためには、菌分離の重要性を引き続き訴えてゆく必要がある。

今年度は、43株の遺伝子解析を行った。

うち、41株の遺伝子型が確定し、27種類の遺伝子型が見出されたが、国内初出の遺伝子型は12で(国外でも報告例がなかったのは7つ)、また、2つの遺伝子型は今まで環境分離株でのみで報告されていた(ST129は温泉分離株、ST739は土壌由来株)が、今年度初めて臨床分離株で見出された。遺伝子型は多様性に富み、本法は高い分別能を有する方法であることが示された。病原性の高い遺伝子型と考えられ、昨年度の調査で増えていたST23よりむしろ、今年度の調査ではST1による症例が多かった。ST1はフランスにおいて、市中感染例のみのST23に対して、免疫抑制状態の患者の感染例や、院内感染例が多いと報告されている⁴⁾。我が国では議論できるほど院内感染例の報告はないが、今回のST1による症例のうち2例が院内感染例によると推定されている。

今回調べられた環境分離株はST1が多かった。今までの調査⁵⁾では、冷却塔水

分離株では7割以上がST1だったのに対し、浴槽水分離株はST1が1割以下と少なく、多様な遺伝子型だった。これは調べられた浴槽水の多くが温泉水で多様な水質だったことを反映しているためと考えられた。今回、修景水やシャワー水由来の *L. pneumophila* 株の遺伝子型を調べたところ、ST1が多く、冷却塔水分離株と似た傾向を示した。これらの水は浴槽水よりは冷却塔水と似た水質であると考えられ、遺伝子型の傾向もそれと一致する。

E. 結論

昨年度に送付されたレジオネラ臨床分離株43株（実際分離年は2006年1月から2011年2月）について同定を行い、うち *L. pneumophila* 株、公園の噴水などの修景水由来の *L. pneumophila* 血清群1の11株についてSBTを行った。その他に、シャワー水由来3株、加湿器由来2株、河川水（水道原水）由来1株の *L. pneumophila* 血清群1を収集し、遺伝子型別を行った。SBTを行った。SBT法の疫学的有用性が確認できるとともに、2010年度はST1が増えているという傾向がわかった。今年度も新規遺伝子型が多数同定されたことから、今後も分離株の遺伝子型を調べ、分離株の動向を明らかにしていく必要がある。

謝辞

今回解析した分離株を分与くださった磯部順子（富山県衛生研究所）、岩渕香織（岩手県環境保健研究センター）、上田ひろみ（長野県環境保全研究所）、勝川千尋

（大阪府立公衆衛生研究所）、奥野ルミ（東京都健康安全研究センター）、金澤祐子（和歌山市衛生研究所）、北川恵美子（石川県保健環境センター）、北橋智子（千葉市環境保健研究所）、小嶋由香（川崎市衛生研究所）、高瀬佳彦（荒川区保健所）、田中忍（神戸市環境保健研究所）、床井由紀（宇都宮市衛生環境試験所）、中嶋洋（岡山県環境保健センター）、原田義高（井上病院）、細谷美佳子（新潟県保健環境科学研究所）、宮基良子（福岡市保健環境研究所）、山本一成（新潟市衛生環境研究所）、吉田英弘（福岡市保健環境研究所）、吉野修司（宮崎県衛生環境研究所）、渡辺祐子（神奈川県衛生研究所）（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-acetylneuraminyl 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_homepage.

php

- 4) Hilbi H, Jarraud S, Hartland E, Buchrieser C. 2010. Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. *Mol. Microbiol.* Apr;76(1):1-11.
- 5) 前川純子 他 : *Legionella pneumophila* の遺伝子型およびモノクローナル抗体型の解析 -浴槽、冷却塔水および土壌分離株と臨床分離株との比較-. 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~平成 21 年度総合研究報告書 (研究代表者: 倉 文明) pp.77-87.
- 6) 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.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 西山明宏, 石田直, 興梶陽平, 小西聡史, 坪内和哉, 伊賀知也, 國政啓, 岩破将博, 福山一, 仲川宏昭, 伊藤明広, 生方智, 吉岡弘鎮, 橋洋正, 有田真知子, 橋本徹, 前川純子 : *Legionella pneumophila* serogroup 3 による呼吸器感染症の4症例. 感染症学雑誌85:373-379 (2011)

2. 学会発表

- 1) 原田義高、吉嶺裕之、諸角美由紀、生

方公子、前川純子、倉 文明、渡辺喜和雄、森本浩之輔、有吉紅也 : MultiplexPCR が有用であった *Legionella pneumophila* serogroup 10 によるレジオネラ肺炎. 第 85 回日本感染症学会総会. 東京、2011 年 4 月.

- 2) Junko Amemura-Maekawa, Akiko Kaneko, Toshiro Kuroki, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Hiroshi Nakajima, Kimiko Kawano, Yuki Tada, and Fumiaki Kura: *Legionella* isolates from patients in Japan. Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* Infections, Vienna, Austria. May 2011.
- 3) Junko Amemura-Maekawa, Kiyomi Kikukawa J. H. Helbig, Katsunori Furuhashi, Masayuki Ichinose, Atsuko Suzuki-Hashimoto, Bin Chang, Miyoko Murai, and Fumiaki Kura: Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from bath water, cooling tower water, and soil in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 2011.
- 4) Fumiaki Kura, Junko Amemura-Maekawa, Akiko Kaneko, Toshiro Kuroki, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Hiroshi Nakajima, Kimiko Kawano, Yuki Tada, and J. H. Helbig: Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 from patients in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 2011.

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）

平成 23 年度 分担研究報告書

公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究

富山県の不明感染源解明のための環境調査

研究分担者 磯部 順子 富山県衛生研究所

研究協力者 金谷潤一 富山県衛生研究所

研究要旨 富山県におけるレジオネラ症患者のおよそ 4 割は感染源が不明である。そこでこれまで調査してきた浴用水以外の感染源を特定するために、環境中に分布する *Legionella* 属菌を調査した。今年度は対象として水溜まり 69 検体と車のウオッシャー液 (31 検体) について調査を実施した。その結果、水溜まりから 33/69 (47.8%)、ウオッシャー液からは 10/31 (32.3%) の *Legionella* 属菌が分離された。水溜まりから分離された *Legionella* 属菌では *L. pneumophila* SG1 がおよそ 2 割と多く、それらのうち *lag-1* 遺伝子保有株がおよそ 5 割と浴用水のそれよりも高かった。ウオッシャー液から分離されたのは *L. pneumophila* SG5 1 株と UT9 株であった。分離された菌について SBT の塩基配列を系統樹解析したところ、感染源不明のヒトから分離された株が、水溜まりから分離された一部の株と遺伝的に近い系統に位置することが明らかとなった。したがって、これら環境中から分離される菌とレジオネラ症との関連性が示された。今後は、これらのヒトへの感染の可能性や感染ルートの解明に向けてさらなる調査が必要である。

A. 研究目的

レジオネラ症については、全国的に報告数が増加傾向にあるが、感染様式や起因为菌である *Legionella* 属菌の病原性など未だ解明されていないことが多い。このレジオネラ症について、富山県ではこの 5 年間の対人口 10 万人の報告数は全国でもっとも多い。これまでの調査の結果、富山県の患者のおよそ 4 割は感染源が浴用水で、2 割は患者の職業から土壌との関連が推定されているが、およそ 4 割は感染源が不明であることを報告している（防菌防黴学会第 38 回年次大会抄録）。

そこで、富山県におけるレジオネラ症患者の発生を予防するため、感染源と感染経

路を明らかにすることを目的として、環境中のレジオネラ属菌の分布状況を調査した。

B. 研究方法

1. 調査対象

感染源調査として、過去の報告^{1,2)}から、調査対象を道路上の水溜まりと、レジオネラ症との関連性が指摘されている車のウオッシャー液を選んだ。

2. 調査期間と試料

水溜まりについては平成 22 年 11 月～23 年 10 月の 1 年間に県内の幹線道路 6 地点（図 1）で採取した 69 検体について、また、車のウオッシャー液については、平成 22 年 6 月～平成 23 年 11 月の間に採取した 31 検

体である。ただし、水溜りの採取は、地点 A~E で 12 回、地点 F で 9 回である。

3. *Legionella* 属菌の分離

Legionella 属菌の分離は、基本的には浴用水の方法に準じて行なった。

①濃縮方法：試料は、水溜りは 150ml、ウォッシャー液は 100ml をメンブレンフィルター（直径 47mm, 0.22 μ m, ミリポア社 ポリカーボネート ISOPORE）で吸引ろ過し、フィルターを 50 倍濃縮量となる量の滅菌蒸留水で 5 分間ボルテックスしたものを試料とした。

②培養法：濃縮検体を酸処理液（0.2M KCl-HCl, pH2.2）と等量混合後、室温で 5 分静置した。混合液 200 μ l を GVPC 培地（日研生物および極東製薬）、および MWY（OXIDO）それぞれ 1 枚ずつコンラージ棒で広げて、35°C で 7 日間培養した。

③分離された *Legionella* 属菌の同定：同定は、平板に発育した *Legionella* 属菌様のコロニーについて、森本の報告³⁾した斜光法で特異的な形態を観察し、血液寒天培地と BCYE- α （ビオメリュー）に移植し、システムの要求性を確認した。次に BCYE- α 培地にのみ発育したコロニーについて、レジオネララテックステスト（OXIDO）とレジオネラ免疫血清（デンカ生研）により血清群を決定した。

④ *lag-1* 遺伝子：分離された *L. pneumophila* SG1 71 株中同一地点から分離され、PFGE パターンが同一であった 9 株を除いた 62 株について、*lag-1* 遺伝子の保有率を調べた。Kozak らの報告⁴⁾したプライマー-*lag-F*: 5'-CTCACAACAAGTCAAGCAAC-3' および *lag-R*: 5'-AAACCATACCAA GCAA CAT-3' を用い、GoTaqHS（プ

ロメガ）10 μ l に *lag-F*, *lag-R*（2 μ M）をそれぞれ 1 μ l, テンプレート 2 μ l を加え、20 μ l になるよう H₂O を加え反応液とした。PCR は 95°C 2 分, 94°C 30 秒, 95°C 30 秒, 72°C 1 分を 30 サイクル, 72°C 5 分で thermal cycler DICE（TaKaRa）でおこなった。

⑤ SBT：*lag-1* 遺伝子の調査と同様、*L. pneumophila* SG1 62 株について、Sequence Type を決定した。方法は前川の報告⁵⁾に準じて行なった。また、その系統樹解析は、7 遺伝子の部分塩基配列をつなげた 2,501 塩基について、MEGA 4 Software を用いて Neighbor-Joining 法で系統樹を作成した。

C. 研究結果

1. 水溜りの *Legionella* 属菌分布状況

①水溜りにおける *Legionella* 属菌の検出

6 地点ごとの検出状況を表 1 に示した。*Legionella* 属菌の検出率は、地点 A が 4/12(33.3%)、地点 B が 5/12(41.7%)、地点 C~E が 7/12 (58.3%)、地点 F は 3/9 (33.3%) で、全体では 33/69 (47.8%) と、今年度の浴用水の検出率よりも高かった。また、水溜りの *Legionella* 属菌は 10~99cfu/100ml あたりとなった検体が 18/33 (54.5%) とおよそ半数を占め、1,000cfu/100ml 以上であった検体は 1 件であった。地点ごとの採水日別の菌数と、気温、水溜りの水温を図 2 に示した。まず、地点 A では、8 月の検体は 10,000cfu/100ml と本調査の中でもっとも高い値を示したが、10cfu/100ml 以上となったのは 4 回と、調査地点の中でもっとも陽性率が低かった。地点 C と E では、陽性率は 7/12 回で、そ

の菌数は 1,000cfu/100ml に達する検体はなく、低い傾向であった。同じく 7/12 の陽性率となった地点 D では、11 月から 4 月へと菌数が増加傾向を示した。気温と菌数のについて全体の傾向を見ると、それぞれの地点でもっとも高い菌数を示した採水日は、7 月が 3 地点、8 月が 2 地点、1 地点は 6 月であり、これらの平均をグラフで示すと、図 3 のように、気温、水温と、*Legionella* 属菌とは関連性があるという結果であった。

②分離された菌の血清群別頻度

水溜りから分離された *Legionella* 属菌 363 株の血清群別の結果を図 4 に示した。UT を除き、もっとも多かったのは *L. pneumophila* SG1 71 株 (19.6%) で、ついで SG5 が 55 株 (15.2%)、SG8 が 50 株 (13.8%) の順であった。また、UT 株は 16S rDNA シーケンスによる菌種の推定では、*L. pneumophila*、*L. longbeachae*、*L. oakridgensis*、*L. gresilensis*、*L. sainthelensis*、*L. waltersii* が含まれた。

もっとも多かった *L. pneumophila* SG1 について、地点ごとの月別分離状況を見ると (表 2)、地点 C では、6/12 回で SG1 が分離され、ついで地点 B、E の 4/12 回であった。また、分離された地点が多かったのは 5 月で、11 月から 6 月の期間に比較的多く分離されていた。

③*L. pneumophila* SG1 の *lag-1* 遺伝子状況

lag-1 遺伝子を保有していたのは、37/62 株 (59.7%) で、本年の浴用水から分離された SG1 の保有率 5/23 (21.7%) より高かった (表 3)。地点別にみた *lag-1* 遺伝子の保有率は、地点 E で 9/9 (100%)、地点 C で 15/26 (57.7%) で 5 割以上と高く、地点 F では

lag-1 遺伝子保有 SG1 は分離されなかった。

④*L. pneumophila* SG1 の SBT による型別

62 株の ST 別頻度を図 5 に示した。およそ 5 割 (29 株) の ST はデータベースに登録されていない型であった。これ以外で多かったのは ST48 (8 株)、ST120 (7 株) であった。この ST120 は、前川ら⁵⁾によると、患者から分離される *L. pneumophila* SG1 で多く認められる ST の一つであるが、感染源は 5 株中 1 株を除いて不明と報告されている型である。

2. 車のウォッシャー液の *Legionella* 属菌の汚染状況

調査したウォッシャー液 31 検体中、*Legionella* 属菌が分離されたのは 10 検体 (32.3%) で、その菌数は 10~99cfu/100ml が 4 件、100~999cfu/100ml が 3 件、1,000cfu/100ml 以上が 3 件であった (表 4)。また、分離された *Legionella* 属菌の血清型は 1 株が *L. pneumophila* SG5、9 株が UT であった。この 9 株について、16S rDNA シーケンスでは、8 株が *L. pneumophila*、1 株が *L. waltersii* と推定された。

3. *L. pneumophila* SG1 の SBT の系統樹解析

L. pneumophila SG1 について、水溜りから分離された 51 株と、浴用水との関連が推定された患者由来 10 株 (●)、浴用水に関連が認められなかった患者由来 9 株 (うち 5 株は浴用施設の利用なし★、4 株は調査なし△)、浴用水由来 51 株、冷却塔水由来 1 株、シャワー水 1 株、計 123 株の系統樹を図 6 に示した。水溜り由来株についてみると、その位置は大きく 3 つに分かれ、内 1 つは浴用水を始め、他の由来株とは大きく離れて位置した。一方、水溜り

り由来株の上方に位置するグループの中に、患者由来株が認められた。その 11 株中、浴用水に関連付けられた患者由来株は 3 株で、残る 8 株はいずれも感染源が推定できない株であった。浴用水由来株のグループに位置する中に患者由来株 2 株があるが、患者が死亡したため、聞き取り調査が実施できなかったため、浴用水の利用に関する情報がなかった。浴用施設の利用がなかった 5 名から分離された *Legionella* 属菌の系統樹における位置をみると、1 株を除き、水溜りから分離された菌のクラスターの中に認められた。また、調査未実施の 4 名においても、2 名からの分離菌はこれら水溜りからの分離菌のクラスター中に位置することが認められた。さらに興味あることに、1 株は、前川らの調査で、患者から比較的多く分離されるものの、環境からの分離報告がなかった ST120 であった。

D. 考察

Legionella 症は 4 類感染症のひとつとして、発生時には患者の届け出とともに患者の行動等の疫学調査および感染源調査が行われる。しかしながら、患者のほとんどが尿中抗原検査で診断され、喀痰培養試験により *Legionella* 属菌が分離されることは少なく、菌の分子疫学的解析等ができないため、感染源の特定が困難となっていることが問題となっている。

富山県におけるレジオネラ症の報告数は年間 20~25 名で、これは平成 23 年においても、前述したとおり、人口対 10 万人報告数 0.2 で、全国でもっとも多かった。富山県において推定される感染源としては、浴用施設がおよそ 4 割となっている。2 割は

土塵などが疑われているが、4 割の患者は感染源が明らかとはなっていない。

本調査の結果から、感染源が推定されない患者から分離された株の多くが、水溜りから分離された *Legionella* 属菌と遺伝的に近い関係にあることが明らかになった。中には、これまでヒトから分離されているにも関わらず、環境からまったく分離されなかったため、感染源が推定さえできなかった ST120 株が水溜りから分離されるなど、水溜りと患者から分離される株には関連性が強く認められた。このことは系統樹解析からも見ても明らかであり、実に興味深い。さらに、水溜りから分離された *L. pneumophila* SG1 のおよそ 5 割が *lag-1* 遺伝子を保有したことは、患者から分離される SG1 株との関連性を推定することができる。なぜなら、昨年報告した患者から分離された *L. pneumophila* SG1 は 1 株を除き、*lag-1* 遺伝子を保有していた (21/22 株 95.5%) こと、また、しばしば感染源と推定される浴用水から分離される *L. pneumophila* SG1 の *lag-1* 遺伝子保有率は、水溜りのそれより低いからである。しかしながら、その菌数は浴用水に比べるとかなり少なく、また、水溜りが直接経口感染するとは考えにくく、その感染経路についてはさらなる調査が必要であろう。水溜りから分離される *Legionella* 属菌の中でもっとも多く分離されたのは *L. pneumophila* SG1 の ST48 であった。この ST は前川ら⁶⁾が土壌に多いことを報告している。すなわち水溜りから分離される *Legionella* 属菌は周辺の土壌に生息する菌を反映するものと考えられる。したがって、患者への直接感染経路となるのは水溜り

であるのか土壌であるのか、あるいは何か別の経路が介在するかなど、対象を広げて調査することが重要であると思われる。

謝辞 本実態調査を実施するにあたり、富山県生活衛生課、各厚生センター、富山市保健所の担当者および採水にご協力いただいた浴用施設の皆様に深謝いたします。

E. 参考文献

- 1) Sakamoto *et al.*, 2009. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1295-1297, *Legionella pneumophila* in Rainwater on Roads.
- 2) Wallensten *et al.*, 2010. *Eur. J. Epidemiol.* 25:661-665. Windscreen wiper fluid without added screenwash in motor vehicles: a newly identified risk factor for Legionnaires' disease.
- 3) 森本 洋. 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. *日本環境感染誌* 2010 ; 25 (8) 8-14.
- 4) Kozak *et al.*, 2009. *J. Clin. Microbiol.* 47:2525-2535. Distribution of *lag-1* Alleles and Sequence-Based Types among *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Clinical and Environmental Isolates in the United States.
- 5) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Jurgen H. Helbig, Bin Chang, Akiko Kaneko, Yuko Watanabe, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Hiroshi Nakajima, Kimiko Kawano, Yuki Tada, Haruo Watanabe and the Working Group for *Legionella* in Japan. 2010.*J. Med. Microbiol.* 59. 653-659. Characterization of *Legionella*

pneumophila isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types.

6) 前川純子, 倉文明, 常 彬, 遠藤卓郎, 鈴木敦子, 市瀬正之, 菊川紀世己, 古畑勝則. *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 - . 「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」厚生労働化学研究費補助金健康安全・危機管理対策総合研究事業、研究代表者倉 文明. 平成21年度総括・分担研究報告書.

F. 研究発表

学会発表

金谷潤一, 磯部順子, 嶋智子, 木全恵子, 綿引正則, 佐多徹太郎: 富山県内で分離された *L. pneumophila* 血清群 (SG) 1 の遺伝子解析. 日本坊菌防衛学会第 38 回年次大会, 2011 年 8 月, 大阪.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

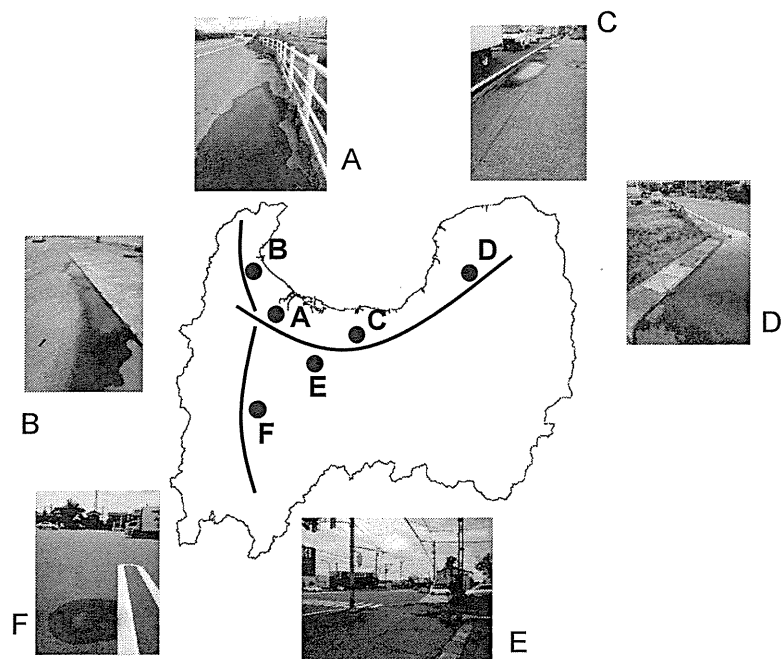


図1. 水溜まり調査地点

表1. 水溜まりの採水地点ごとの*Legionella*属菌の分離率と菌数

地点	陽性数 / 検体数	陽性検体の <i>Legionella</i> 属菌数(cfu/100ml)		
		≤10-99	100-1,000	1,000≤
A	4 / 12	3	0	1
B	5 / 12	2	3	0
C	7 / 12	4	3	0
D	7 / 12	2	5	0
E	7 / 12	5	2	0
F	3 / 9	2	1	0
合計	33 / 69	18	14	1