

図2. 調査地点別気温・水溜り水温・分離菌数

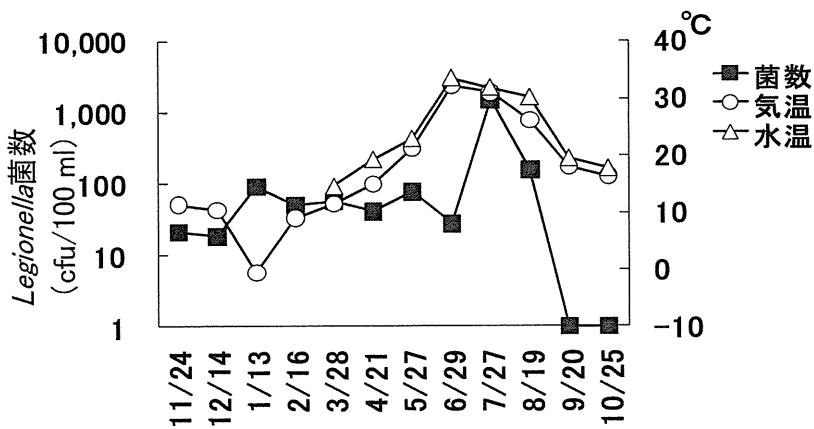


図3. 気温・水溜り水温・分離菌数の推移(全採水地点平均)

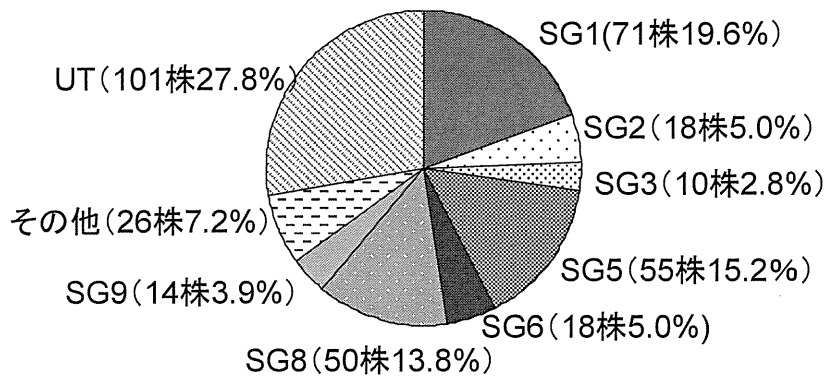


図 4. 水溜まりから分離された Legionella 属菌の血清群

表2. 採水地点別 *L.pneumophila* SG1 の分離状況

地点	採水(月)										計	
	11	12	1	2	3	5	6	7	8	9		10
A	5						3					8
B	1		1	3		1						6
C	5	1	7			16	2		6			37
D			1		4							5
E				6		5	3		1			15
F												0
合計	11	1	9	9	4	22	8	0	7	0	0	71

表3.採水地点別*L.pneumophila* SG1の*lag-1*保有率

	<i>lag-1</i> / SG1
地点 A	4 / 8
地点 B	3 / 6
地点 C	15 / 26
地点 D	6 / 13
地点 E	9 / 9
地点 F	0 / 0
合計	37 / 62

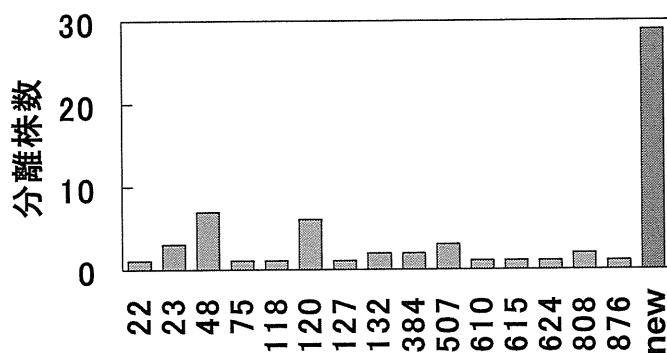


図5. 水溜まりから分離された*L.pneimophila* SG1のSBTによるST別頻度

表4.ウオッシャー液の*Legionella*属菌数

菌数	検体数
10 未満	21
10 - 99	4
100 - 999	3
> 1000	3
合計	31

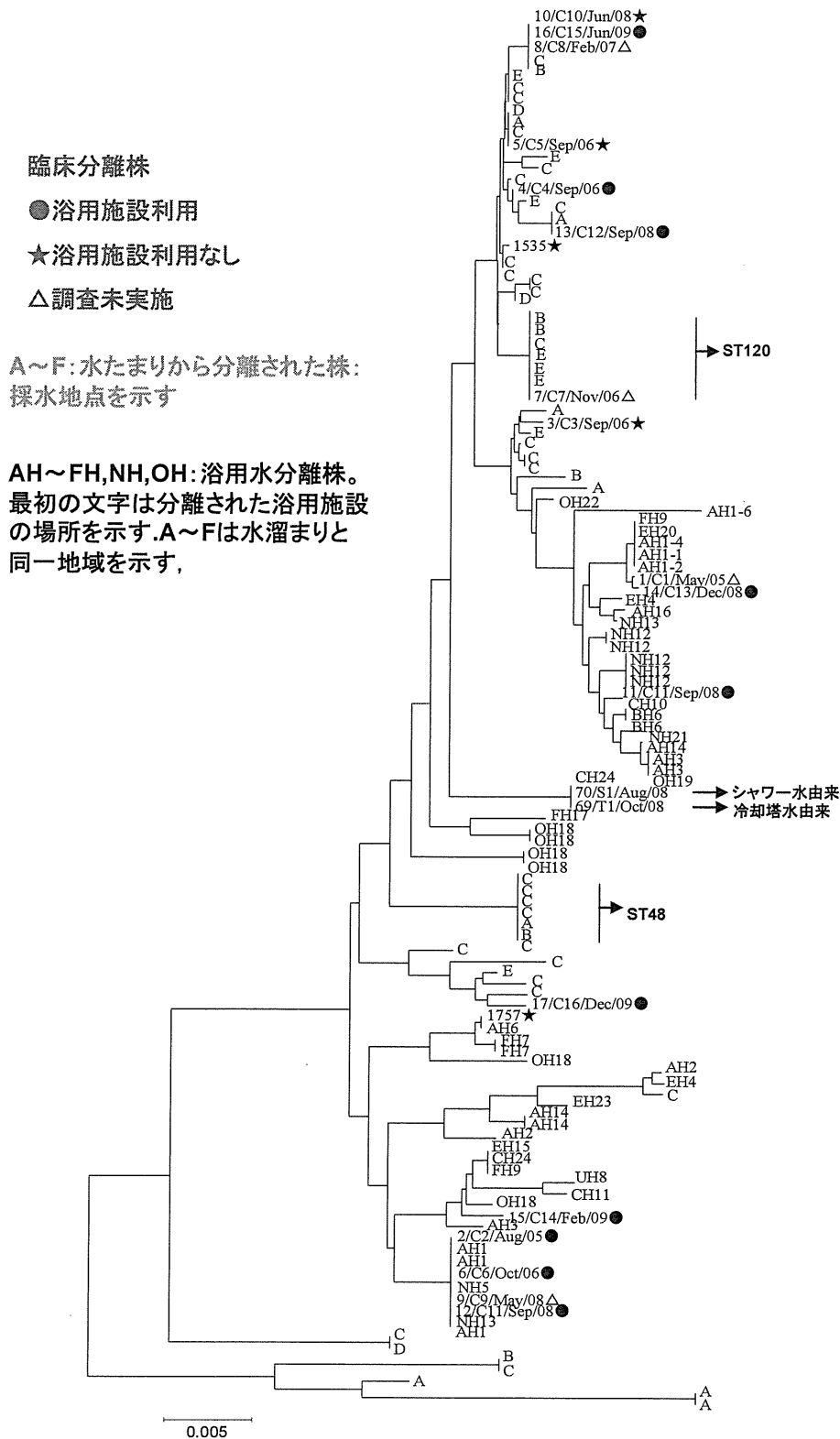


図 6. *L.pneumophila* SG1のSBT塩基配列の系統樹解析

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

感染源不明クラスターに関連した環境、菌株調査について(平成 23 年度)

研究分担者 中嶋 洋 岡山県環境保健センター

研究要旨

県内のレジオネラ症散発患者から分離された *L.pneumophila* のうち、血清群 3 の株は 2008 年～2011 年までに 7 株あり、これらすべての株が **sequence-based typing (SBT)** 法による型別の結果、**sequence type (ST) 93** に型別された。このことから、7 名の患者は同一の感染源あるいは環境中に分布した同一の株により感染した可能性が、示唆された。そこで、その感染源を究明するため、平成 23 年度は浴槽水等 49 検体を調査して、レジオネラを分離した。また、保健所の調査で分離されたレジオネラ菌株を収集した。これらの菌株と患者株を用いて分子疫学的解析を行った結果、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE) 法を用いた分子疫学解析でも、患者由来の 7 株は同じ PFGE パターンを示した。一方、浴槽水等から分離された *L.pneumophila* 血清群 3 の 11 株は、患者の ST あるいは PFGE パターンと異なっていた。したがって、患者の感染源は現状では不明であるが、過去に分離・収集した菌株や、今後多種類の検体についてさらに調査を行い、感染源を究明していく必要がある。

A.研究目的

公衆浴場等入浴施設の衛生管理については、平成 13 年度以来、厚生労働省の研究班に参加して調査研究を行っている。また、中四国ブロックのレジオネラレファレンスセンターとして、患者および環境等由来株の収集、血清群別などを行ってきた。患者由来株は平成 19 年より収集しているが、平成 20 年ごろから *L.pneumophila* 血清群 3 の菌株が多数分離されている¹⁾。国立感染症研究所に依頼して、これらの株の遺伝子解析を行った結果、すべての株が同じ遺伝子型に型別され、全国的にも未だ検出されていない遺伝子型であることが分かった。そこで、この様に地域特異的な菌の汚染調査

を行うと共に、患者の感染源を究明するために、本年度より調査を開始した。

B.研究方法

(1)材料

平成 23 年 6 月～12 月に浴槽水等 49 検体を採水し、レジオネラ属菌の検査を実施した。また、病院が分離した患者由来株 22 株と、平成 23 年 4 月～12 月に保健所が分離した浴槽水等の環境由来株 133 株を収集し、血清群別および分子疫学解析に供した。

(2)方法

レジオネラの検査は、従来の培養法を

用いて行った。分離株及び収集した菌株の血清群別は、レジオネラ免疫血清(デンカ生研)により実施した。また、菌株相互の関連性を検討するために、菌の遺伝子を用いた分子疫学解析を行った。sequence-based typing (SBT) 法による型別は国立感染症研究所で実施し、sequence type (ST)を決定した。パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE) 法による解析は、改良プロトコールによる2日間の方法²⁾を用い、当センターで実施した。

(倫理面への配慮)

患者株の収集にあたっては、患者情報から個人の特が定できないように、最低限の情報のみ示した。

C.研究結果

公衆浴場の浴槽水等49検体について検査した結果を、表1に示した。

レジオネラは9検体(18.4%)から検出され、浴槽水は9.3%、冷却塔水では83.3%検出された。浴槽水では*L.pneumophila* 血清群1、6、9、冷却塔水は*L.pneumophila* 血清群1、5、7、13、型別不能とその他のレジオネラ属菌が検出された。

県内の保健所が調査して分離したレジオネラ菌株を、当センターが収集して血清群別を実施した。その結果は、表2に示した。収集したレジオネラ菌株は133株で、浴槽水、冷却塔水およびプール水由来株である。収集したレジオネラの菌種は、浴槽水は*L.pneumophila* 血清群1、3、4、5、6、8、9、10、12、型別不能と*L.micdadei*、冷却塔水は*L.pneumophila* 血清群1、型別不能とその他のレジオネラ属菌、プール水は

L.pneumophila 血清群3、5、10であった。

一方、今までに収集した患者由来のレジオネラ菌株を、表3に示した。22株のレジオネラ菌株は、すべては*L.pneumophila* であり、血清群は1が14株、2が1株、3が7株であった。血清群1の株により感染した患者では、発熱、咳嗽、頭痛、下痢などの症状以外に、呼吸困難、意識障害、肺炎などの重症例が多く見られた。これに対して、血清群3に感染した患者では、胸部異常影が観察されてはいるが比較的軽微な症状が多かった。患者株の SBT 法による解析では、血清群1の株では多種類のSTに分類され、ST1077の3株は国内で始めて分離された。血清群3の菌株は、7株すべてが同じSTに型別され、PFGEパターンも同一であった。

L.pneumophila 血清群3に感染した患者の感染源究明のため、浴槽水から分離した*L.pneumophila* 血清群3の菌株11株との関連性を検討した。SBT法およびPFGE法により、浴槽水由来株の分子疫学的解析を行い、その結果を表4および図1に示した。

浴槽水由来株のうち、SBT法を実施した7株は、STおよびPFGEパターンとも、施設⑤の1株(ST:1137、PFGE:B)を除いて施設毎に異なっていた。特に、施設⑤で分離された3株(ST:1138、PFGE:A)は、STの新規遺伝子型であった。これら以外の株についても、PFGEパターンは施設毎に異なっており、各施設の浴槽水は、それぞれ異なった遺伝子型の菌により汚染されていた。また、これらの菌株のSTおよびPFGEパターンは、患者由来株といずれも異なっていた(図1)。

D. 考察

県内では、本年度 37 名のレジオネラ症患者が発生しており、前年度まで最も患者数の多かった平成 20 年度 (25 名) の 1.5 倍に増加した。全国的に見ると 7 番目に多い数字であるが、多くの場合診断に尿中抗原検査を用いている現状では、患者から原因菌が分離されることはなく、感染源の究明を困難にしている。そこで、平成 19 年より病院の検査室にご協力を戴き、レジオネラ症患者から分離された菌株の収集を始めた(表 3)。患者由来株はすべて *L.pneumophila* であり、最も検出頻度の高かった血清群は 1 で、次いで血清群 3、血清群 2 の順であった。血清群 1 の感染患者は症状が厳しく重症例が多いのに対して、血清群 3 の場合は比較的軽い症状の傾向が見られた。病院の検査担当者の話によると、当該病院では、呼吸器内科を受診した患者すべてについて、レジオネラの検査を実施している。そのため、通常では症状の軽い血清群 3 の菌は、検査されることなく、見逃されている可能性があると思われる。

患者株を分子疫学的に解析した結果、血清群 1 の菌株は、多種類の ST に型別された。このうち、ST609 と ST1077 は 3 株ずつであったが、同じ ST 株が検出された患者相互の疫学的な関連は不明であった。このうち、特に ST1077 については、今まで確認されていない新規遺伝子型で、本年度はじめて分離されたものである。今後、本 ST 株が限定された地域に分布しているのかどうかを確認するため、同じ ST 株による患者の発生状況や環境からの分離に注意していく必要がある。血清群 3 の 7 株は、いずれも ST93 で PFGE

パターンも一致しており、同一菌である可能性が高い。これらの ST93 の菌も、上記血清群 1 の ST1077 株同様に、検出された地域は現在まで本県下に限定されている。このことから、これらの菌では県内に特有の感染源が存在する可能性が考えられる。また、一方では、血清群 3 の菌による感染患者は、血清群 1 による感染患者に比べて患者の症状が比較的軽いため、見逃されていることも考えられる。他県の検査施設においても、患者検体について詳細なレジオネラ検索を行えば、血清群 3 の菌が検出される可能性があるかもしれない。いずれにしても、当県の環境中における血清群 1、ST1077 および血清群 3、ST93 の汚染実態調査を継続して行い、患者の感染源の究明や環境中での両菌の分布を把握することが重要と考える。このことが、両菌による感染予防と感染拡大防止に繋がるものと、考える。

なお、本調査について、患者株の分与を戴きました、倉敷中央病院検査課の藤井寛之先生、川崎医科大学附属病院検査課の黒川幸徳先生に深謝いたします。

E. 結論

- 1) 県内のレジオネラ症散発患者から *L.pneumophila* が 22 株分離された。
- 2) このうち血清群 1 は 14 株、血清群 3 は 7 株であった。
- 3) 血清群 3 の 7 株はすべて同じ PFGE パターンおよび ST であった。
- 4) 血清群 3 の感染源の究明のため、継続して環境調査を実施する必要がある。

F.参考文献

- 1)西山 明宏、石田 直、興梠 陽平、他：
Legionella pneumophila serogroup 3 による
 呼吸器感染症の4症例. 感染症誌 2011；
 85:373-379.
- 2)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. IASR 2008 ; 29 :

G.研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 浴槽水等のレジオネラ検査結果

検体名	検体数	陽性検体数(%)	菌種	血清群	株数
浴槽水	43	4 (9.3)	<i>L.pneumophila</i>	1	3
				6	3
				9	1
冷却塔水	6	5 (83.3)	<i>L.pneumophila</i>	1	4
				5	1
				7	1
				13	1
			UT	1	
			<i>Legionella spp.</i>		2
計	49	9 (18.4)			17

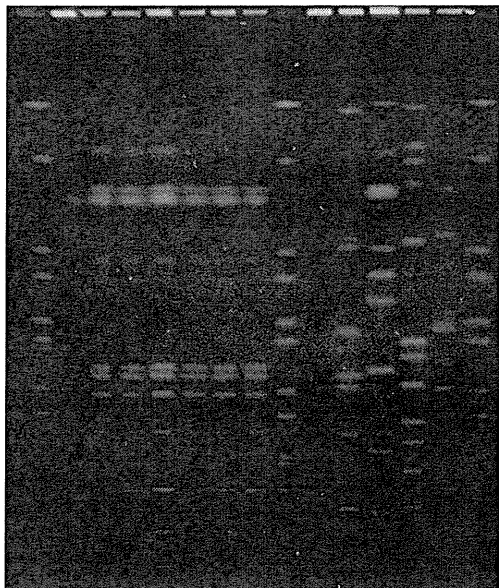
表2 保健所から収集したレジオネラ株

検体名	菌種	血清群	株数
浴槽水	<i>L.pneumophila</i>	1	16
		3	21
		4	7
		5	22
		6	25
		8	1
		9	2
		10	14
		12	2
	UT	10	
	<i>L.micdadei</i>		1
冷却塔水	<i>L.pneumophila</i>	1	1
		UT	3
	<i>Legionella spp.</i>		1
プール水	<i>L.pneumophila</i>	3	3
		5	2
		10	2
計			133

No	年齢	性別	分離年月	血清群	ST	PFGE	症状
1	64	男	2007.10	1	595	未実施	発熱、咳嗽、呼吸困難、肺炎
2	69	男	2007.10	1	593		発熱、呼吸困難、意識障害、肺炎
3	59	男	2008.09	1	609		発熱、頭痛、呼吸困難、意識障害、肺炎
4	79	男	2008.09	1	609		発熱、呼吸困難、肺炎
5	55	男	2008.09	1	594		発熱、咳嗽、意識障害、肺炎
6	37	男	2009.07	1	550		発熱、下痢、咳嗽、意識障害
7	54	男	2009.08	1	23		発熱、呼吸困難、肺炎
8	58	男	2010.01	1	609		発熱、肺炎
9	69	男	2010.05	1	42		発熱、意識障害、肺炎
10	55	女	2011.07	1	1077		発熱、胸部異常影(糖尿病あり)、呼吸困難
11	78	男	2011.10	1	120		発熱、呼吸困難、肺炎
12	78	男	2011.11	1	検査中		腹痛、呼吸困難、意識障害、肺炎、多臓器不全
13	91	男	2011.11	1	1077		発熱、咳嗽、肺炎
14	69	男	2011.12	1	1077		発熱、咳嗽、意識障害、肺炎
15	63	男	2011.06	2	354	未実施	発熱、咳嗽、肺炎から死亡(糖尿病あり)
16	66	男	2008.06	3	93	同一	発熱、咳嗽、肺炎
17	58	女	2008.07	3	93		胸部異常影、症状無し
18	79	男	2008.08	3	93		胸部異常影、症状無し
19	60	女	2010.04	3	93		発熱、呼吸困難、肺炎
20	74	男	2010.07	3	93		発熱、肺炎
21	77	男	2011.07	3	93		胸部異常影、症状無し
22	59	女	2011.09	3	93		胸部異常影、症状無し

採取年月日	施設	泉質	残留塩素濃度	菌数cfu/100ml	ST	PFGE	STの備考
2009/11/26	①	不明	>2.0	5	未実施	F	
2011/2/3	②	不明	0	220	未実施	G	
2012/4/11	③	アルカリ性単純温泉	0	1700	未実施	H	
2012/11/1	④	温泉	<0.05	2000	1032	D	国内臨床株1例SG5あり
2012/11/24	⑤	水道	>2.0	50	1138	A	ST新規遺伝子型
2012/11/24		水道	>2.0	10	1137	B	ST新規遺伝子型
2012/11/24		水道	>2.0	40	1138	A	ST新規遺伝子型
2012/11/24		水道	>2.0	10	1138	A	ST新規遺伝子型
2012/11/24	⑥	温泉	0.2	10	614	C	国内温泉由来株1例SG1あり
2012/11/24		温泉	0.3	30	614	C	国内温泉由来株1例SG1あり
2012/12/1	⑦	アルカリ性単純温泉	0	20	未実施	E	

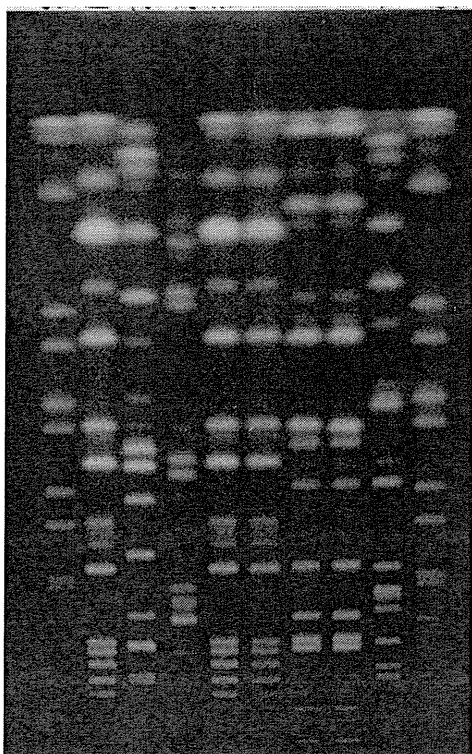
M 1 2 3 4 5 6 7 M 9 10 11 12 M



レーン 1 : 患者菌株 No18
レーン 2 : 患者菌株 No20
レーン 3 : 患者菌株 No17
レーン 4 : 患者菌株 No19
レーン 5 : 患者菌株 No22
レーン 6 : 患者菌株 No16
レーン 7 : 患者菌株 No21
レーン 9 : 浴槽水株 No 1
レーン 10 : 浴槽水株 No 2
レーン 11 : 浴槽水株 No 3
レーン 12 : 浴槽水株 No 11
M : マーカー(*S.Braenderup*)

図 1 患者および浴槽水由来 *L.pneumophila* 血清群 3 の PFGE 解析

M 1 2 3 4 5 6 7 8 M



レーン 1 : 浴槽水株 No 5
レーン 2 : 浴槽水株 No 6
レーン 3 : 浴槽水株 No 4
レーン 4 : 浴槽水株 No 7
レーン 5 : 浴槽水株 No 8
レーン 6 : 浴槽水株 No 9
レーン 7 : 浴槽水株 No10
レーン 8 : 浴槽水株 No11
M : マーカー(*S.Braenderup*)

図 2 浴槽水由来 *L.pneumophila* 血清群 3 の PFGE 解析

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）
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

平成23年度分担研究報告書

抗酸菌の調査とレジオネラ subspecies 分類法の検討

研究分担者	○山崎 利雄	国立感染症研究所	バイオセーフティ管理室
研究分担者	前川 純子	国立感染症研究所	細菌第一部
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	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所	
研究分担者	縣 邦雄	アクアスつくば総合研究所	
研究分担者	磯部 順子	富山県衛生研究所	
研究分担者	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター	

研究要旨：調査地域を関東地方から拡大し、公衆浴場等から検出される抗酸菌の再調査をおこなった。総検体数232検体から抗酸菌陽性は50検体、検出された抗酸菌は65株であった。*Mycobacterium avium*は、19株が検出された。また、市販DDHでは、*Legionella pneumophila*までしか同定できないが、DNA-DNAハイブリダイゼーション法の改良により、*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascullei* の3亜種の鑑別が可能な方法を確立した。

A. 研究目的

結核菌以外の抗酸菌（非結核性抗酸菌）は、環境中に広く分布している。しかし、健常人にとっては、ほとんどが日和見感染菌である。したがって、環境中に非結核性抗酸菌が検出されたからといって、即、健常人が病気になるわけではない。循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化の検討をするために、おこなった平成16年度～平成18年度の調査でも、レジオネラ属菌とともに、非結核性抗酸菌が検出された¹⁾。また、非結核性抗酸菌症の原因菌のうち臨床的に重要な*Mycobacterium avium*が当時の調査では最も多く検出された¹⁾。家庭用の24時間風呂から*M. avium*が検出されたという報告²⁾はあるが、病気との関連は明確

に証明されていない。そこで、ヒト、動物、公衆浴場の浴用水等から検出された*M. avium*の縦列反復数可変領域（Variable Numbers of Tandem Repeats；VNTR）のパターンを比較する方法^{3) 4)}を用いて、環境中の*M. avium*の分布状況を調べ、*M. avium*症を引き起こしやすいVNTRパターンの関連性について検討し、公衆浴場等におけるレジオネラ属菌とともに*M. avium*の対策に役立てることを最終目的とした。前年度は、研究室保存の*M. avium*を用いてVNTR解析法をおこない、VNTR法は、*M. avium*分布状況調査で、菌株鑑別能力と簡便性において大変有用であり、今後の*M. avium*分布調査に役立つ方法であると報告⁵⁾した。今年度は、以前の調査から5年以上経過し、調査地域も関東地

方南部に限られていたため、調査地域を拡大して、公衆浴場等から検出される抗酸菌の菌種が増えるかどうかの再調査をおこなった。また、*Legionella pneumophila*は、*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascullei*の3亜種に分類されることが知られている⁶⁾。市販DDHでは、*L. pneumophila*までしか同定できない⁷⁾ので、簡便なDNA-DNAハイブリダイゼーション法により、3亜種の鑑別が可能かどうかの検討をおこなった。

B. 研究材料と研究方法

1. 抗酸菌の検出と増菌培養

関東、中部、北陸、九州地方の各衛生研究所管内のホテル、旅館、又は公衆浴場等の浴用水等のサンプル採取を依頼した。採取された浴槽水等の100mlを3000回転30分間遠心検出後の沈渣を、1mlの滅菌精製水に再懸濁した。この懸濁液1mlに等量の4%NaOHを加えて、室温で20分間処理後、このアルカリ処理液0.1mlずつを2~3本の2%小川培地に接種し36±1°Cで培養し、コロニーの出現状況を毎週観察した。コロニー陰性の場合には8週間まで培養した。検出された菌を国立感染症研究所にて、チール・ネルゼン染色法で抗酸菌である事を確認後、滅菌精製水で微濁浮遊液10倍希釈系列で希釈し、それぞれの0.1mlずつをMiddlebrook 7H10寒天培地に接種し、5%CO₂フランキ内で36±1°Cで2~3週間培養後、単コロニーを釣菌し、純化したのち1%小川培地にて増菌した。又は、各地方衛生研究所にてレジオネラ属菌検出のために調整された100倍濃縮液の約1mlを凍結し、国立感染症研究所に輸送後、再溶解し、前述の方法にて培養、純化後、増菌後同定

試験に供した。

2. 抗酸菌同定試験

生化学的検査法による同定試験は、極東抗酸菌鑑別セット(極東製薬工業)を用いた。試験操作法、観察判定日、観察判定法は、使用説明書にしたがった。抗酸菌鑑別セット使用による同定試験は、発育速度、集落性状、着色、光発色性試験、p-ニトロ安息香酸(PNB)500μg/ml含有培地上の発育、エタンブトール(EB)5μg/ml含有培地上の発育、ピクリン酸(PA)0.2%含有培地上の発育、p-アミノサリチル酸(PAS)2mg/ml含有培地の黒変、塩酸ヒドロキシルアミン(HA)500μg/ml含有培地上の発育、硝酸塩還元試験、Tween80水解試験である。さらに、アリルスルファターゼ試験を追加した。これらの生化学的検査法その他、主な抗酸菌18菌種の同定が可能なDDHマイコバクテリア‘極東’キット(極東製薬工業)を用いた。DDH試験法の操作、判定は、使用説明書⁸⁾に従った。また、16S-rRNAのDNAシーケンスも行った。

3. DNAの抽出

1%小川培地、Middlebrook 7H9液体培地、Middlebrook 7H10寒天培地で増菌させ、菌塊をインスタジーンマトリックス200μlに入れ、ヒーティングブロックを用いて56°C15~30分処理後、10秒間のボルテックスによる攪拌を行い、100°Cで8分間加熱殺菌をするとともにDNAの抽出を行った。10秒間のボルテックスによる攪拌、12,000回転で3分間高速遠心してその上清をテンプレートDNAとした。

4. 検出菌の16S-rRNAのDNAシーケンス

生化学的検査法やDDH試験法において同定不能と判定された菌株および同定結果を再確認するために、検出菌からDNAを抽出し、16S-rRNAを標的としたプライ

マー16Ss (5' GAGAGTTTGATCCTGGCT CAG3')と16Sas (5' TGCACACAGGCCACA AGGGA 3')を用いてPCRを行い、PCRプロダクトを High pure PCR product Purification kit (ペーリンガーマンハイム社)を用いて精製後、Dye terminator cycle sequencing 法にてDNAを標識し、スピнкаラム法により未反応の蛍光色素を取り除いた後、ABI310シーケンサーにてシーケンスをおこなった。得られた結果を Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDM)あるいは、NCBI の nucleotide-nucleotide BLAST のデータベースと比較して、菌種の決定を行った。

5、レジオネラ subspecies 分類法の検討
国立感染症研究所細菌第一部にて保存の *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* (NIIB0001)、*L. pneumophila* subsp. *fraseri* (NIIB0005)、*L. pneumophila* subsp. *pascaliei* (NIIB0150)を基準株に用いた。BCYE α 培地にて35°Cで4日間培養し、DNAを抽出、精製後、0.5 μ gをマイクロプレート(Nunc 468667)に固定させた。また、対照として、*E. coli*を固定したマイクロプレートを作成した。同上の基準株3菌種と環境検出菌株で16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定法にて *L. pneumophila* と同定された株を用いた。DDH法のハイブリダイゼーション温度を50~75°Cまで5°C間隔で変化させ、ハイブリダイゼーションの時間は、60分~180分の30分間隔で調べた以外の操作・判定は、市販DDHレジオネラ‘極東’キット(極東製薬工業)の作業手順⁷⁾に従い、市販のキット内の試薬類を用いた。

C. 研究結果

1、抗酸菌の検出状況

今年度、関東、中部、北陸、九州地方の各衛生研究所管内のホテル、旅館、又は

公衆浴場等についてレジオネラ菌調査と共に抗酸菌調査も行った。抗酸菌用の調査した総検体数232検体から抗酸菌陽性は50検体、抗酸菌は65株検出された。その内訳を表1に示した。結核菌は、検出されなかった。ラニオンの抗酸菌群分類では、I群菌(光発色菌)は *M. asiaticum* 1株、*M. kansassi* 5株、*M. simiae* 2株であった。II群菌(暗発色菌)は、*M. gordonae* 15株、*M. intermedium* 1株、*M. scrofulaceum* 1株であった。III群菌(非発色菌)は、*M. avium* 19株、*M. intracellulare* 2株、*M. terrae* 5株であった。IV群菌(迅速発育菌)は、*M. fortuitum* 3株、*M. mucogenicum* 1株、*M. peregrinum* 2株、*M. phlei* 5株であった。その他に、3株検出されているが、現在同定作業中である。

2、レジオネラ subspecies 分類法の検討

1) ハイブリダイゼーション条件の検討

L. pneumophila subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascaliei*を基準株として固定したマイクロプレートを作成し、ハイブリダイゼーション温度と時間の検討を行った。市販DDHレジオネラ‘極東’(極東製薬工業)が指定するハイブリダイゼーション温度である50°Cでは、3亜種の鑑別ができなかった(図1)。65°C以上では、発色が見られなかった。60°Cでは、特異性は高いが、発色までに30分以上の時間がかかるため不正確であり、55°Cが適当と思われた(図2)。また、ハイブリダイゼーションの時間は、60分~180分の30分間隔で調べたが、90分以上は変わらないので、市販キットの条件と同じ90分間とした。

2) DDH法によるレジオネラ subspecies の鑑別

L. pneumophila と同定された菌株について

て、ハイブリダイゼーション温度 55～57℃でハイブリダイゼーションの時間 90分の条件で DDH 法を行った結果を表 2 に示す。 *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascullei*としてそれぞれ同定された。また、*L. pneumophila*の 3 亜種は、肉眼でも明確に鑑別する事ができた (図 3)

D. 考察

我が国の新規登録の全結核患者数は、2010年には23,261人で、罹患率(人口10万対)は18.2であった。前回と今回の浴槽水調査では、結核菌(*M. tuberculosis*)は、検出されなかったことから、浴槽水から結核菌に感染する可能性は、ほとんどないと考えられた。しかし、232検体から非結核性抗酸菌が65株検出された。そのうち、*M. kansasii* 5株、*M. goodii* 15株、*M. scrofulaceum* 1株、*M. avium* 19株、*M. intracellulare* 2株、*M. terrae* 5株、*M. fortuitum* 3株、*M. peregrinum* 2株は、非結核性抗酸菌症の病因菌となりうる。前回の調査¹⁾でも、183検体中、25検体から抗酸菌43株が検出されたが、非結核性抗酸菌症のうちで最も多い *M. avium* が 22 株検出されていたことから、レジオネラ菌対策と同様に、浴槽や、配管の浄化・洗滌・消毒をするよう提言する必要があると思われた。前年度、当研究室保存の *M. avium* を用いて VNTR 解析法をおこない、VNTR 法は、*M. avium* 分布状況調査で、菌株鑑別能力と簡便性において大変有用であると報告⁵⁾したが、今後、今回検出された環境由来の *M. avium* について、VNTR 解析法を実施し、*M. avium* 症を引き起こしやすい VNTR パターンと、環境中に存在する *M. avium* との関連性について検討し、公衆浴場等にお

ける *M. avium* の対策に役立てたい。

抗酸菌と同様に日和見感染菌であるレジオネラ属菌のうち、わが国で最も多く検出される *Legionella pneumophila* は、*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascullei* の 3 亜種に分類されることが知られている⁶⁾。しかし、これらの 3 亜種を鑑別するには、DNA ホモロジーでしか規定できないため、一般の検査室では実施できない。また、簡便な、市販の DDH レジオネラ ‘極東’ キットでは、*L. pneumophila* までしか同定できないので、DNA-DNA ハイブリダイゼーション法の改良により、3 亜種の鑑別が可能かどうかを検討した。それぞれの基準株をプレートに固着させ、被検菌から抽出した DNA と 55～57℃で 90 分間ハイブリダイゼーションを行わせることにより、*L. pneumophila* の 3 亜種を鑑別することが可能になった。*L. pneumophila* subsp. *pneumophila* は、4, 5, 7, 15 を除く 1-14 の血清群で、*L. pneumophila* subsp. *fraseri* は、4, 5, 15 の血清群、*L. pneumophila* subsp. *pascullei* は 5 の血清群のみがあると報告されている。今後、実際に、臨床検出株、環境検出株の *L. pneumophila* の亜種の同定数を増やし、*L. pneumophila* の血清群との関連を検討する予定である。

E. 結論

自然界に広く分布している抗酸菌用の再調査を行った。総検体数 232 検体から抗酸菌陽性は 50 検体、抗酸菌は 65 株検出された。検出菌の同定を行い、結核菌(*M. tuberculosis*)は、検出されなかったが、*M. avium* 19 株他、ヒトに病原性のある非結核性抗酸菌が同定された。これらの菌種は、非結核性抗酸菌症の感染源となり得

るので、浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化を検討することが必要である。

L. pneumophila subspecies の同定は困難であるが、*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascaliei* の3亜種は、DDH法を用いて簡単に鑑別同定する事ができる方法を確立した。

F. 参考文献

1) 山崎利雄、杉山寛治、大畑克彦：浴槽水からの抗酸菌の検出状況と検出株の同定。厚生労働科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）「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」主任研究者遠藤卓郎、平成16年度～平成18年度総合・分担研究報告書 p 67-73

2) 斉藤肇、村上 和保、石井則久、榎赫 圃、「24時間風呂」からの *Mycobacterium avium* complex の検出、結核 75: 19-25、2000

3) 西森 敬、内田郁夫、田中 聖、西森知子、今井邦俊、柏崎佳人、村田典久、神間清恵、VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル、動衛研研究報告第109号、25-32、2003.

4) 森山誠、小川賢二、西森敬、打矢恵一、伊藤哲也、八木哲也、中島一光、中川拓、垂水修、二改俊章、臨床由来 *Mycobacterium avium* における Variable Numbers of Tandem Repeats 型別解析法の有用性の検討、結核 81: 559-566、2006

5) 山崎利雄、前川純子：抗酸菌の調査 (*Mycobacterium avium* の遺伝子型)。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）「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」主任研究者倉文明、平成23年度分担研究報告書 p 207-213

6) Don J. Brenner et al., *Legionella pneumophila* serogroup lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* subsp. nov., *L. pneumophila* subsp. *fraseri* subsp. nov., and *L. pneumophila* subsp. *pascaliei* subsp. nov. J Clin. Microbiol.:1988 Sep;26(9):1695-1703

7) DDH レジオネラ‘極東’（極東製薬工業株式会社）使用書

8) DDH マイコバクテリア‘極東’（極東製薬工業株式会社）使用書

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1) 山崎利雄、臨床、動物、公衆浴場の浴用水等から検出された *Mycobacterium avium* における VNTR 法による検討、第86回日本結核病学会総会、2011、6月、東京
2) 山崎利雄、杉山寛治、前川純子、泉山信司、遠藤卓郎、倉 文明、臨床および循環式浴槽水等から検出された *Mycobacterium avium* の縦列反復数可変領域 (VNTR) を用いた解析、第81回実験結核研究会、2011.6月、東京

H. 知的所有権の取得状況
なし

表1 浴槽水等から検出された抗酸菌の同定結果

分類	菌種名	菌株数	由来内訳 (株)			
			関東	中部	北陸	九州
I群菌	<i>M. asiaticum</i>	1		1		
	<i>M. kansassi</i>	5	1	4		
	<i>M. simiae</i>	2	1	1		
II群菌	<i>M. gordonae</i>	15	9	4	1	1
	<i>M. intermedium</i>	1	1			
	<i>M. scrofulaceum</i>	1		1		
III群菌	<i>M. avium</i>	19	3	5	7	4
	<i>M. intracellulare</i>	2	2			
	<i>M. terrae</i>	5	3	2		
IV群菌	<i>M. fortuitum</i>	3	1	1		1
	<i>M. mucogenicum</i>	1	1			
	<i>M. peregrinum</i>	2		1		1
	<i>M. phlei</i>	5		1	1	3
	同定作業中	3				3
合計		65	22	21	9	13

表2 *L. pneumophila* のDDH法による3亜種の同定

固相菌種	被検菌の吸光度測定値 (630nm)						
	NIIB0001	NIIB0003	NIIB0004	NIIB0063	NIIB0150	NIIB2781	NIIB2782
A <i>E. coli</i>	0.053	0.056	0.045	0.049	0.071	0.06	0.047
B <i>pneumophila</i>	0.535	0.329	0.182	0.189	0.241	0.181	0.089
C <i>fraseri</i>	0.257	0.173	0.397	0.378	0.347	0.243	0.139
D <i>pascullei</i>	0.219	0.149	0.231	0.202	0.596	0.465	0.234
E	0.034	0.034	0.035	0.026	0.033	0.025	0.048
F	0.028	0.028	0.036	0.035	0.034	0.034	0.043
G	0.029	0.03	0.035	0.034	0.032	0.032	0.049
H	0.031	0.03	0.035	0.035	0.034	0.035	0.048

Max/blank	10.1	5.9	8.2	7.7	8.4	7.8	4.97
相対類似度	42.3	42.9	52.8	46.5	52.6	45.2	49.2

判定菌種 *pneumophila* *pneumophila* *fraseri* *fraseri* *pascullei* *pascullei* *pascullei*

判定基準：

- (1) 最も強く発色したウェルの吸光度 (Max. Abs.) が対照ウェル(A)の吸光度 (Blank Abs.) の1.9倍以上
- (2) 2番目に強く発色したウェルの吸光度 (2nd. Abs.) の相対類似度が70%以下

$$\text{相対類似度 (\%)} = (2\text{nd. Abs.} - \text{Blank Abs.}) / (\text{Max. Abs.} - \text{Blank Abs.}) \times 100$$

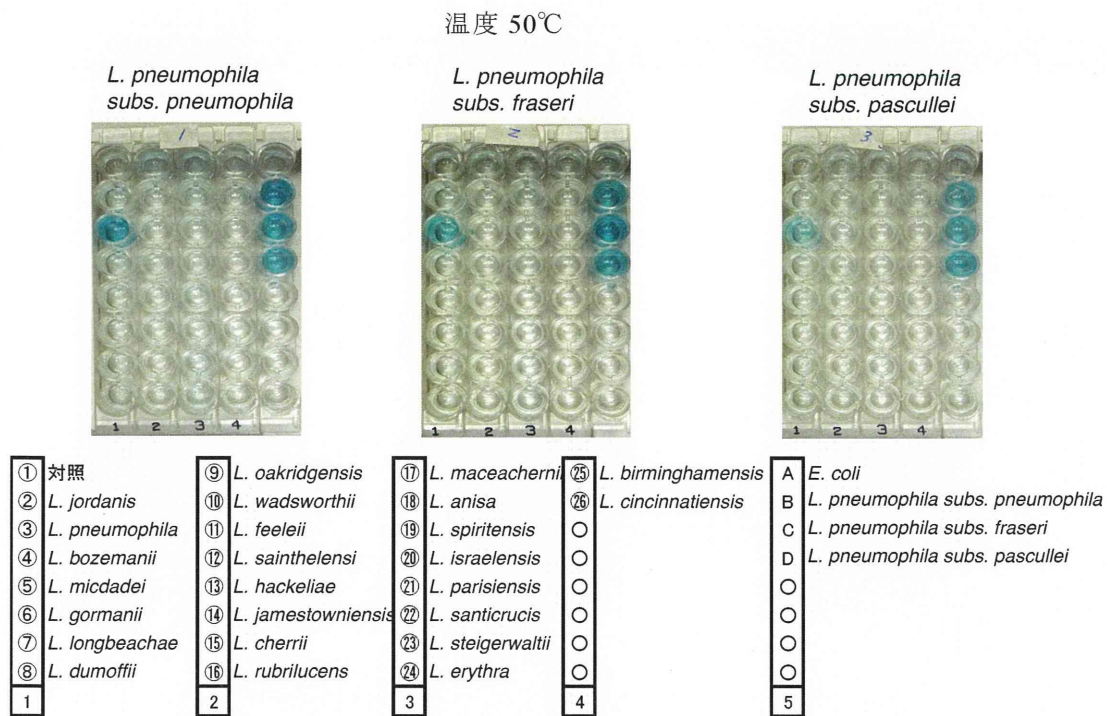


図1 基準株の培養菌を用いた DDH 法による同定試験

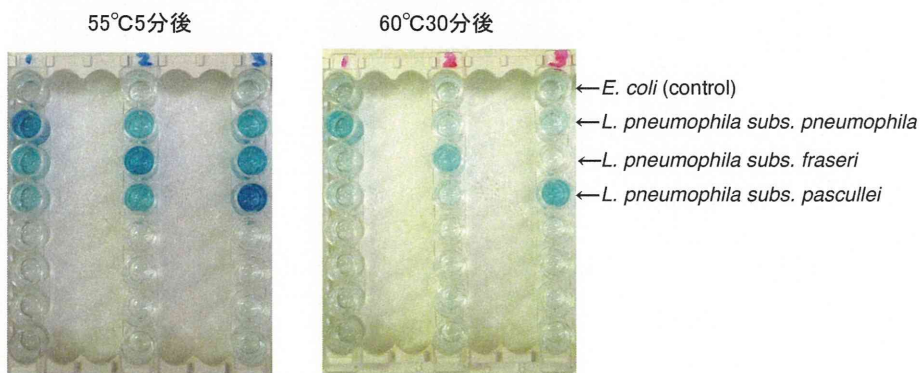


図2 ハイブリダイゼーション温度と発色時間の検討

ハイブリダイゼーション温度56~57°C 発色基質添加5分後

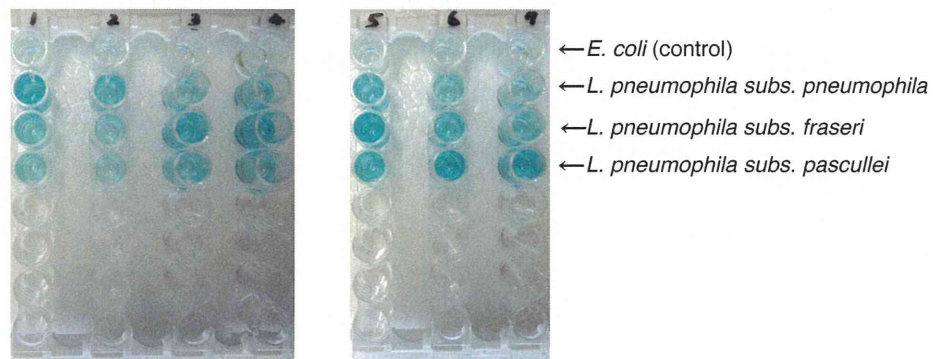


図3 DDH 法による *L. pneumophila* 亜種の同定試験

「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」

レジオネラ属菌対策における宿主アメーバの管理
— モノクロラミンの *Acanthamoeba* に対する不活化効果 —

研究分担者 国立感染症研究所 寄生動物部 八木田健司
協力研究者 国立感染症研究所 寄生動物部 泉山信司

概要

レジオネラ属菌の宿主アメーバである *Acanthamoeba* に対するモノクロラミン(結合型塩素)の効果を実験的に調べた。*Acanthamoeba* 浴槽水分離株を用いて、大腸菌培養で調整したシストおよび無菌培養で調整した栄養体を試料として、モノクロラミンの濃度と作用時間を変えてアメーバの生残性を培養法で調べた。その結果、モノクロラミンの実用的濃度とされる 3mg/L の条件で、栄養体は 15 分間(Ct 値:47)で、またシストは 24 時間(Ct 値:3700)で 3log の生残性低下が認められた。以上の結果から、浴槽水の衛生管理手法としてのモノクロラミン消毒が宿主アメーバに対しても実用性があることが示唆された。

A. 研究目的

レジオネラ属菌による浴槽水消毒には一般に塩素消毒(遊離塩素)が使用されるが、消毒の困難な状況が現場で多く認められることから、新たな消毒方法の開発が求められている。この点に関しては、結合型塩素の作用を有するモノクロラミンの消毒剤としての安定性と安全性が近年評価され、現場への試験導入も進められている。本研究では、レジオネラ属菌の生物学的汚染要因として重要な環境中の宿主アメーバに対するモノクロラミンの効果に関して、未だその知見は少ないことから実験的にその作用効果を明らかにし、アメーバコントロールにおけるモノクロラミンの可能性を検討した。

B. 研究方法

1) 供試アメーバ:

Acanthamoeba sp. HS/O7-8 株(温泉浴槽水分離)を用いた。シスト(嚢子)への作用実験には大腸菌塗布寒天培地で培養したアメーバを用いた。増殖した栄養体を回収しおよそ 10^3 cells/ml に調整後、その 1ml を新鮮な大腸菌塗布寒天培地全面に均一に広げ風乾し 30°C にて 2 週間培養することでほぼ培地全面で同調的にシスト化させた。この方法により age の差が少ないシストを多量に得た。一方、栄養体への作用実験には試料へのシスト混入を除外するために、シスト化が起きにくい無菌培地である PYGC を用いて HS/O7-8 株を培養した。培養は 25cm² の組織培養フラスコ内で 5ml の PYGC を用いて 30°C にて行った。培養中、シスト形成が生じないことを顕

微鏡で確認した。

2) モノクロラミン調整

30ml の AS(アメーバ用生理食塩水)に対し、次亜塩素酸ナトリウム溶液を $65\mu\text{l}$ 加え混合、次に 0.5M 塩化アンモニウム溶液(フィルターろ過済み)を $243\mu\text{l}$ 加えて混合しこれをストック溶液とした。AS を用いてストック溶液を希釈し、試験用モノクロラミン溶液を試験直前に調整し、全塩素濃度を測定した。測定には HACH の装置および試薬を用いた。

3) モノクロラミン作用試験

(1) 1 時間作用試験

大腸菌培養シストは寒天培地上に 2ml の AS を入れ、ループで培地表面を擦るようにしてシストを剥離し、浮遊させた。この浮遊液を 10ml 遠心管に回収し 10% SDS 溶液 $20\mu\text{l}$ を加え数秒間ボルテックスし 1 分間放置、混入した栄養体を破壊した。 500g 、 5 分間遠心し上清を除去した後、再び AS を 5ml 加えてシストを再浮遊し遠心した。シストを 1ml の AS に再浮遊し血算盤で濃度を測定した。栄養体は培養中のフラスコを氷上にて 15 分間冷却することで接着面から剥離させ、培地とともに 10ml 遠心管に移し 500g 、 5 分間遠心した。上清を除去した後、再び AS を 5ml 加えて栄養体を再浮遊し遠心し、上清を除去した。さらに同操作を 1 回繰り返して完全に培地を除去した後、 1ml の AS に栄養体を再浮遊し濃度を測定した。

50ml の遠心管を用いて 3mg/L および 30mg/L 調整したモノクロラミン溶液 10ml に 2.5×10^4 のシストあるいは栄養体が含まれるように調整し、 15 分間および 60 分間、 35°C のウォーターバス中でインキュベートした。各経過時間毎に 2ml を採取しモノクロラミン濃度を測定した。残る 8ml に中和用の 0.1M チオ硫酸ナトリウム・ 5 水和物塩溶液(ミリポアカートリッジフィルター、 $0.45\mu\text{m}$ 、PVDF でろ過したもの)を 1ml 加え混和、さらに 1ml の大腸菌溶液を加え 10ml に再調整した(シストおよび栄養体の濃度は 2.0×10^3 / ml に調整された)。このアメーバ浮遊液と同濃度の大腸菌を含む AS を希釈用溶液として調整し、 2.0×10^3 / ml のアメーバ溶液を元液として、希釈溶液を用いて 2.0×10^2

/ ml 、 2.0×10^1 / ml のアメーバ浮遊液を各 10ml 調整した。アメーバを含む元液ならびに希釈液 0.5ml を 90mm 径無栄養寒天培地プレートに広げ風乾後、 30°C にて培養を行いアメーバ増殖の有無を確認した。各実験条件につき 5 枚のプレートを用いた。なお対照試験としてモノクロラミン処理をしないシストおよび栄養体の試験も同時に行った。

(2) 24 時間作用試験

本試験ではシストのみ使用した。 1 時間作用試験と同様な方法でシストを調整し、 3mg/L のモノクロラミン溶液を用いて 1 時間作用試験と同様な方法で実験を行った。試験プレートは各実験条件 3 枚とした。

C. 研究結果

1) 1 時間作用試験

結果を表 1 に示した。シストへの作用は 2 回試験し各経過時間におけるモノクロラミン実測値の推移からは 1 時間作用した時点でほとんど濃度低下は認められず安定的な作用であったことが示された。モノクロラミン 3mg/L 、 15 分間(平均 Ct 値: 55)の作用ではシストの生残性は対照と変わらなかったが、 30mg/L 、 15 分間(平均 Ct 値: 444)の作用では 1000 シスト培養条件でも増殖が認められない場合が認められた。さらに 30mg/L 、 60 分間(平均 Ct 値: 1728)の作用では 2 回の試験で 1000 シスト培養条件でも増殖が認められなかった。以上の結果から Ct 値 1700 で 3-log 以上のシスト不活化が生じることが示唆された。

一方栄養体への作用に関しては、調べた試料のシスト含有率は顕微鏡検査で 0.1% 以下であることを確認し、 1000 栄養体使用条件でもシストの混入影響は極めて低いと考えられる条件で行った。試験の結果、 3mg/L 、 15 分間(Ct 値: 47)の作用で 1000 栄養体培養条件でも生残は認められず、Ct 値 45 程度で 3-log 以上の栄養体不活化が生じることが示唆された。

2) 24 時間作用試験

結果を表 2 に示した。 1 時間作用試験では影響のなかった 3mg/L の条件で、 5 時間(Ct 値:

810)作用させた場合ではシストの生残性の低下は認められなかった。しかし、24 時間(Ct 値: 3700)の作用では3-log以上のシスト不活化が生じることが示めされた。

D. 考 察

モノクロラミンの浴槽衛生管理への導入が見込まれる中で、レジオネラ属菌の宿主となる環境中のアメーバに対するモノクロラミンの作用を実験的に明らかにした。試験したアメーバは実際に浴槽水より分離された環境株で、特に消毒効果を知るべきシストについては、実際の水系環境に準じて細菌を用いた培養法により形成したシストを試験した。これにより野性株の性質を備えたシストに対するモノクロラミンの効果を試験する条件が設定された。

安全性が明らかでかつ実用濃度とされる3mg/Lのモノクロラミン作用は、本研究の結果を見ると、その栄養体に対する作用は強力な消毒レベルの強さと考えられた。この濃度条件が維持される管理状況では、浴槽中でのアメーバ増殖が抑制されレジオネラ属菌の増殖の場、あるいは薬剤からの逃避の場が失われることで、遊離する菌の消毒に加え、根本的にレジオネラ属菌汚染を抑制できることが見込まれる。加えて従来薬剤消毒が困難であったシストに対しても、3mg/Lで24時間の作用、Ct値3700が維持される条件ではその不活化作用は3log程度が期待できる結果を得た。シストへの効果に関しては、ある一定のCt値の確保で安定した不活化が可能であるかもしれない。さらに試験回数を増やしCt値と不活化の関係を明確にしたい。

本研究の結果は、実際的なモノクロラミンの使用条件でシストを含め宿主アメーバを抑制できる可能性を示している。実際の浴槽環境ではアメーバ、レジオネラ属菌とも他の多様な微生物群とともにバイオフィーム内に存在することが想定され、今回の実験結果と同様のモノクロラミンの有効性を見込むことは難しいが、モノクロラミンのバイオフィーム浸透性(残留塩素よりも優れた安定性)やモノクロラミンの試験導入を行っている施設ではアメーバの検出率が極めて低いという調査データ等を考慮すると、モノクロラミン消毒方法が今後の浴槽衛生管理の有効な手段となるのではないかと考えられる。モノクロラミンによるシスト不活化に関しては、多様な宿主アメーバ株への作用性、また不活化シストの生死の検証を計画している。

E. 結 論

浴槽水中のレジオネラ属菌消毒として、その実用性が見込まれるモノクロラミンが、実験的ではあるが宿主アメーバに対しても実用濃度で抑制効果があることが示された。

F. 参考文献

なし

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