

4. 0.4 μm あるいは 0.45 μm MF における アメーバ増菌レジオネラ通過実験

フォルダーの種類によってアメーバ増菌レジオネラが 0.4 μm あるいは 0.45 μm の MF を通過するかについて検討を行い、孔径によって回収率に差が生じた原因について確認することにした。

その結果、0.4 μm のポリカーボネート MF と 0.45 μm セルロースアセテート MF では、通過する場合があった(表 4)。しかし、0.45 μm セルロース混合アセテート MF では通過しなかった(表 5)。さらに MF の装着による漏れかどうか確認するために、市販の滅菌ろ過用一体型のフィルターで濃厚菌液($10^7\text{CFU}/\text{ml}$) 500 μl を用いてシリンジでろ過を行うと 0.45 μm セルロースアセテート MF で通過するが、0.45 μm セルロース混合エステル MF では、通過しないことが確認された(表 6, 7)。レジオネラ症防止指針第 3 版にレジオネラ属菌の大きさは、幅 0.3~0.9、長さ 2~20 μm ⁷⁾ と記載されており、0.4 あるいは 0.45 μm の MF の場合は、レジオネラ属菌が通過する可能性が示唆された。今回、MF とフォルダーとの関連性については、さらに検証が必要であると考える。

5. ハイドロキシアパタイトを用いた検討

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 0.4 μm ポリカーボネート MF、0.45 μm セルロースアセテート MF またはセルロース混合エステル MF の回収率をろ材を用いることで 0.2 μm 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 0.4 μm あるいは 0.45 μm のろ過フィルターにろ材としてハイドロキシ

アパタイトを添加することにより、孔径 0.2 μm の MF 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。

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 μm ポリカーボネート MF、孔径 0.45 μm セルロースアセテート MF あるいはセルロース混合エステル MF で同様に検討した(表 8-1, 2, 3)。

その結果、ポリカーボネート MF に AP20C を 0.8 g 添加した時に、孔径 0.4 μm の MF フィルターで孔径 0.2 μm ポリカーボネート MF よりも高い回収率となった。また、セルロースアセテート MF にハイドロキシアパタイト AP20C を 0.4 g 添加した時にも同様の効果が得られた。効果が得られた際のろ過時間は、いずれも 0.2 μm ポリカーボネート MF よりも早く効率がよいことが確認された。混合セルロースエステル MF については、今回の条件では効果が得られなかった。ここで、複数回実施した検討では回収率にバラツキがみられ、再現性が課題であった。

ハイドロキシアパタイトの効果について、泉山ら⁸⁾がクリプトスポリジウムの捕捉において、15%の粒子を用いることによって9割あるいはそれ以上の捕捉率を得ている。この結果を参考にして適したハイドロキシアパタイトの粒径を考えると、レジオネラ属菌の大きさは、幅 0.3~0.9、長さ 2~20 μm とされ⁷⁾、これを捕捉するには 2.0~6.0 \times 13.3~133.3 μm のハイドロキシアパタイトが適する可能性がある。今回使用した AP20C の粒径は、2.00~64.0 μm (平均 19.26 μm) であり、その有用性についてはさらに検討する必要がある。

D. 結論

1. MF を用いたろ過濃縮法においては、回収率のバラツキの要因のひとつとして MF の材質・孔径が関与していることが示された。
2. 今回、アメーバ増菌レジオネラを用いたろ過濃縮法による回収率は、 $0.2\mu\text{m}$ ポリカーボネートが最もよいことが示された。
3. ポリカーボネート $0.4\mu\text{m}$ 、セルロースアセテート $0.45\mu\text{m}$ の MF では少量のレジオネラが通過するが、混合エステル $0.45\mu\text{m}$ では通過しないことが示された。
4. ろ材（ハイドロキシアパタイト）の効果は、粒子を小さくすることにより効果が得られることがあるが、再現性についてさらに検討が必要である。

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) 枝川亜希子、木村明生、三輪由佳、田中榮次、足立伸一、宮本比呂志、レジオネラ検査ろ過濃縮法におけるメンブランフィルター材質の回収率比較、日本防菌防黴学雑誌、Vol. 41. No. 2. 63-66 (2013)

5) 小澤克行、岩瀬尚子、日野隆信、山崎雅之、濱田孝敏、今関久和、レジオネラ属菌の試験結果に及ぼすろ過濃縮法のメンブランフィルターの影響について、日本防菌防黴学会抄録、43、東京 (2010)

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

7) レジオネラ症防止指針第3版、財団法人ビル管理教育センター、p47 (2009)

8) 泉山信司、遠藤卓郎、粉体ろ過によるクリプトスポリジウム濃縮保存法の開発、水道協会雑誌、第81巻、第9号 (第939号)、14-22 (2012)

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 アメーバに接種した平板培養菌の菌数(550nm,OD値0.35)

回	30°C4日間培養	
	CFU/ml	
1	4.5×10^8	
2	4.3×10^7	
3	4.2×10^8	
4	7.6×10^8	
5	2.1×10^9	
6	1.4×10^8	
7	2.0×10^9	

(GVPC α 培地使用)

表2 アメーバ増菌レジオネラ菌液における550nmのOD値

回	30°C7日間培養	
	OD値	
1	0.066	
2	0.127	
3	0.139	
4	0.017	
5	0.014	
6	0.027	
7	0.038	
8	0.100	
9	0.173	
10	0.173	

表3 アメーバ増菌培養菌を用いたメンブランフィルターの材質・孔径による回収率

No.	メンブランフィルター ¹⁾	孔径 (μm)	n	回収率(%)		0.2 μm ポリカーボネートと比較 P値 ²⁾
				平均	SD	
1	ポリカーボネート	0.20	7	86.5	33.04	
2	ポリカーボネート	0.40	6	51.3	17.35	0.04*
3	セルロースアセテート	0.20	6	67.5	36.02	0.35
4	セルロースアセテート	0.45	9	51.5	17.94	0.03*
5	セルロース混合エステル	0.20	4	40.1	21.36	0.02*
6	セルロース混合エステル	0.45	6	48.7	22.13	0.03*

1) No.1-5: ADVANTEC、No.6: MILIPORE

2) t検定

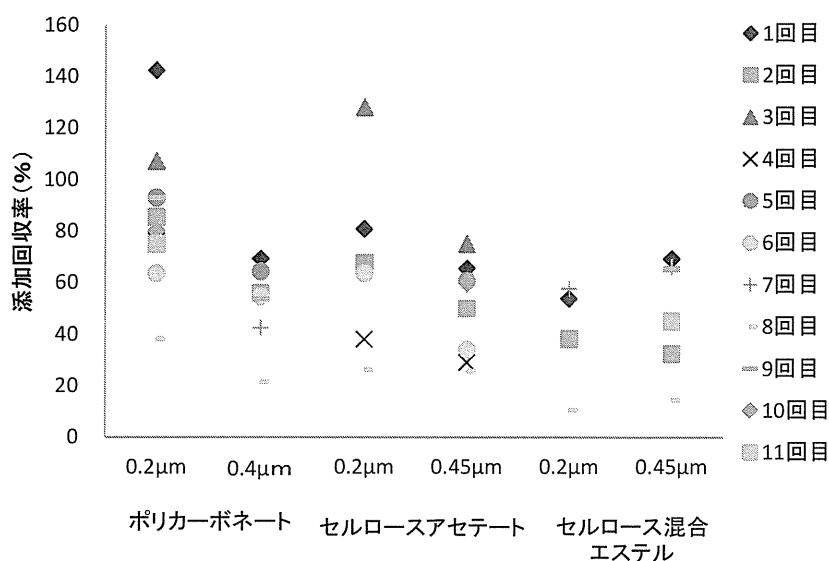


図1 ろ過フィルターの材質・孔径による回収率

(GVPC α 培地使用、アメーバ除去: 5 μm フィルター使用)

表4 アメーバ増菌レジオネラのフォルダー別孔径0.4あるいは0.45 μmメンブランフィルターにおける通過検討結果

No.	材質	フィルター ¹⁾		Aフォルダー使用		Bフォルダー使用		Cフォルダー使用	
		1段目	2段目	回収菌数	回収率	回収菌数	回収率	回収菌数	回収率
		孔径 (μm)	孔径 (μm)	CFU/100ml (%)		CFU/100ml (%)		CFU/100ml (%)	
				440 (100)		590 (100)		340 (100)	
1	ポリカーボネート	0.4	0.2	22 (5.0)		23 (3.8)		ND (-)	
2	セルロースアセテート	0.45	0.2	0 (0)		5.7 (1)		0 (0)	
3	セルロース混合エステル	0.45	0.2	ND ²⁾ (-)		0 (-)		ND (-)	

(検水量: 500ml × 2、GVPC α 培地使用)

1) ADVANTEC、径47mm 2段目ポリカーボネート使用

2) ND: Not done

表5 アメーバ増菌レジオネラの孔径0.45 μmメンブランフィルターにおける通過検討結果

No.	材質	フィルター ¹⁾		Cフォルダー使用		Cフォルダー使用	
		1段目	2段目	回収菌数	回収率	回収菌数	回収率
		孔径 (μm)	孔径 (μm)	CFU/100ml (%)		CFU/100ml (%)	
				340 (100)		495 (100)	
1	ポリカーボネート	0.2	0.2	0 (0)		0 (0)	
2	セルロースアセテート1	0.45	0.2	0 (0)		ND (-)	
3	セルロースアセテート2	0.45	0.2	0 (0)		ND (-)	
4	セルロースアセテート3	0.45	0.2	0 (0)		ND (-)	
5	セルロースアセテート4	0.45	0.2	0 (0)		ND (-)	
6	セルロースアセテート5	0.45	0.2	0 (0)		ND (-)	
7	セルロース混合エステル1	0.45	0.2	ND ²⁾ (-)		0 (0)	
8	セルロース混合エステル2	0.45	0.2	ND (-)		0 (0)	
9	セルロース混合エステル3	0.45	0.2	ND (-)		0 (0)	
10	セルロース混合エステル4	0.45	0.2	ND (-)		0 (0)	
11	セルロース混合エステル5	0.45	0.2	ND (-)		0 (0)	

(検水量: 500ml × 2、GVPC α 培地使用)

1) ADVANTEC製、径47mm 2段目ポリカーボネート使用

2) ND: Not Done

表6 アメーバ増菌レジオネラの孔径0.4 μmメンブランフィルターにおける通過検討結果

No.	メンブランフィルター (ADVANTEC)	孔径 (μm)	Cフォルダー使用		Cフォルダー使用	
			回収菌数	回収率	回収菌数	回収率
			CFU/500 μl (%)		CFU/500 μl (%)	
			3.7×10^7 (100)		4.0×10^7 (100)	
1	ポリカーボネート	0.4	∞ ¹⁾ (-)		∞ (-)	
2	ポリカーボネート	0.4	∞ (-)		∞ (-)	
3	ポリカーボネート	0.4	∞ (-)		∞ (-)	

(検水量: 菌液500 μl (3.7×10^7 CFU)を1/50PBS49.5mlに添加、全量50mlとした、GVPC α 培地使用)

1) ∞: 菌数が多いことにより計数不可

表7 アメーバ増菌レジオネラの孔径0.45 μ m一体型滅菌ろ過フィルターにおける通過検討結果

No.	一体型フィルター (ADVANTEC)	孔径 (μ m)	回収菌数		回収率		回収菌数		回収率	
			CFU/500 μ l	(%)	CFU/500 μ l	(%)	CFU/500 μ l	(%)		
			2.2×10^8	(100)	3.7×10^7	(100)	4.0×10^7	(100)		
1	セルロースアセテート	0.45	244	(0.00011)	972	(0.0026)	$\infty^{2)}$	(-)		
2	セルロースアセテート	0.45	268	(0.00012)	63	(0.0002)	∞	(-)		
3	セルロースアセテート	0.45	1	(0.0000005)	976	(0.0026)	∞	(-)		
4	セルロースアセテート	0.45	ND ¹⁾	(-)	804	(0.0022)	∞	(-)		
5	セルロースアセテート	0.45	ND	(-)	1028	(0.0028)	∞	(-)		
6	混合セルロースエステル	0.45	0	(0)	0	(0)	0	(0)		
7	混合セルロースエステル	0.45	0	(0)	0	(0)	0	(0)		
8	混合セルロースエステル	0.45	0	(0)	0	(0)	0	(0)		
9	混合セルロースエステル	0.45	ND	(-)	0	(0)	0	(0)		
10	混合セルロースエステル	0.45	ND	(-)	0	(0)	0	(0)		

(検水量: 500 μ l、GVPC α 培地使用)

1) ND: Not Done

2) ∞ : 菌数が多いことにより計数不可

表8-1 アメーバ増菌培養菌を用いたハイドロキシアパタイト(AP20C)の効果

No.	フィルター ¹⁾		ろ材		ろ過時間 min	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			7.30	260	(92.9)
2	ポリカーボネート	0.4			3.13	150	(53.6)
3	ポリカーボネート	0.4	AP-20C ²⁾	0.4	4.56	175	(62.5)
4	ポリカーボネート	0.4	AP-20C	0.8	5.26	280	(100.0)
5	ポリカーボネート	0.4	AP-20C	1.6	8.54	70 ³⁾	(1.1)

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

表8-2

No.	フィルター ¹⁾		ろ材		ろ過時間 min	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			7.18	160	(80.0)
2	セルロースアセテート	0.45			2.52	120	(60.0)
3	セルロースアセテート	0.45	AP-20C ²⁾	0.4	3.16	170	(85.0)
4	セルロースアセテート	0.45	AP-20C	0.8	3.46	115	(57.5)
5	セルロースアセテート	0.45	AP-20C	1.6	5.24	40	(20.0)

(添加菌数200CFU/100ml、検水量: 500ml \times 2、GVPC α 培地使用)

表8-3

No.	フィルター ¹⁾		ろ材		ろ過時間 min	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			5.34	150	(75.0)
2	セルロース混合エステル	0.45			1.24	90	(45.0)
3	セルロース混合エステル	0.45	AP-20C ²⁾	0.4	3.06	80	(40.0)
4	セルロース混合エステル	0.45	AP-20C	0.8	4.06	70	(35.0)
5	セルロース混合エステル	0.45	AP-20C	1.6	6.30	33	(16.5)

(添加菌数200CFU/100ml、検水量: 500ml \times 2、GVPC α 培地使用)

1) ADVANTEC製、径47mm

2) 積水化成品工業(株)

3) 添加菌数6500CFU/100ml

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

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、SBT (sequence-based typing) 法を用いて遺伝子型別を行った。2011 年度に収集された臨床分離株は 45 株（すべて *Legionella pneumophila*）で 38 人の患者から分離された。分離株数に対して患者数が少ないのは、3 人の患者から、それぞれ 4 株（4 種類の血清群）、4 株（すべて血清群 1 だが、4 種類の遺伝子型）、2 株（2 種類の血清群）の *L. pneumophila* が分離されたためである。3 人とも溺水事例だった。感染源が入浴施設と推定されているのが 12 例（32%）で、例年半数近くが入浴施設であるのに比べ少なかった。血清群の内訳は血清群 1 が 37 株、血清群 3、6 が各 2 株、血清群 2、9、12、型別不能が各 1 株だった。臨床分離株 45 株は 32 種類の遺伝子型に分けられ、そのうち新規遺伝子型は 13 種類であった。環境分離株は、今年度収集したものおよび過去に収集したが報告していなかった血清群 1 の分離株について、由来が同じで重複していると思われる株を除く、冷却塔関連株 13 株、シャワー水 3 株、加湿器 2 株、浴槽関連株 20 株、計 38 株について遺伝子型別を行った。一部は感染源調査に付随して分離されたものだが、患者分離株と遺伝子型が一致する場合もしない場合もあった。冷却塔水由来株は ST1 が多いことが知られているが、今年度の調査でも半数が ST1 だった。浴槽水は多様性に富んでいた。加湿器やシャワー水についてはさらに検査数を増やす必要がある。

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、レジオネラ症の起原菌として最も多い *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、レジオネラ症の感染源として知られる冷却塔水や浴槽水などからの環境分離株のうち、起因菌として最も多い血清群1の菌株についても遺伝子型別を行った。

B. 研究方法

1 臨床分離株

昨年度（2011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45株（2008年に分離された2株以外は2011年2月から2012年2月までに分離されたもの、すべて *Legionella pneumophila*）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-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。

2 環境分離株

環境由来の *L. pneumophila* 血清群1を38株（冷却塔水等分離株13株、シャワー水分離株3株、加湿器分離株2株、浴槽関連分離株20株）を収集し、遺伝子型別を行った。

C. 研究結果

臨床分離株45株は38人の患者から分離されたものである。分離株数に対して患者数が少ないのは、3人の患者から、それぞれ4株（4種類の血清群）、4株（すべて血清群1だが、4種類の遺伝子型）、2株（2種類の血清群）の *L. pneumophila* が分離されたため、3例とも溺水事例だった。わが国のレジオネラ症患者の主要な感染源は入浴施設であることが知られているが、感染源が入浴施設と推定されているのが12例（32%）で、例年半数近くが入浴施設であるのに比べ少なかった。ほかに畑や家庭菜園と推定されているのが3例、院内感染疑い事例が1例、

土木作業現場と推定されているのが1例、エアコン（推定）が1例、震災における津波（河川）での溺水が1例となっている。半数（19例）は感染源不明だった。血清群の内訳は *L. pneumophila* 血清群1が37株、血清群3、6が各2株、血清群2、9、12、型別不能が各1株だった。45株の遺伝子型は32の遺伝子型に分けられた。一昨年度から見られているST23の減少現象は続いており、ST23だった4株のうち2株は2008年分離分だった。今までほとんどが温泉感染事例だったST138は3株分離された（ただし、温泉事例は1株のみで、1株は感染源不明で、1株は水道水の浴槽水で温泉ではなかった）。感染源不明株が多いST120も3株分離された（1例は、感染源は畑と推定され、残りの株は感染源不明である）。同一県内で分離され続けているST93（血清群3）は2011年度も6例目、7例目が分離された。新規遺伝子型であるST1077株が同一県内から、7月、11月、12月と分離されたが、関連は不明である。国内で初めてのST256も2株収集され、新規遺伝子型であるST1136が同一検体由来の異なる血清群（9と型別不能）の2株で見られた。世界中から分離されるST1は、昨年度は1株だったのを初め、25種類のSTは1株ずつだった。新規遺伝子型は13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 *L. pneumophila* 血清群1の38株（冷却塔水等分離株13株、シャワー水分離株3株、加湿器分離株2株、浴槽

関連分離株20株）の遺伝子型別の結果を表2に示した。ST1が9株（冷却塔水等分離株6株、加湿器分離株1株、浴槽水分離株2株）を占め、ST138が4株（すべて浴槽関連株）、ST1008が3株（新規遺伝子型、2株が冷却塔水、1株がシャワー水由来）あった。他にST59（浴槽水由来）、ST566（浴槽水由来）、ST986（新規遺伝子型、冷却塔水由来）が2株ずつあった他は、15株の遺伝子型はそれぞれ異なっており、38株は20種類の遺伝子型に分けられた。

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。この傾向は一昨年度から同様である。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つたであろう。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、菌分離は重要である。

今年度は、45株の遺伝子解析を行った。32種類の遺伝子型が見出されたが、そのうち13種類は国内外で初めて見出された遺伝子型で、2種類は国内初出だった。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再確認された。

今までの調査⁴⁾同様、冷却塔水分離株で

は ST1 が多く、浴槽水からは ST1 が検出されるものの少なく、多様な遺伝子型だった。今回は患者発生に伴い検査された浴槽水から分離された菌株についても SBT を行った。10 例 (11 株) のうち 7 例 (8 株) が患者分離株と一致した。今回は、感染源からの分離株と ST が一致した事

例はすべてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 像も一致していたが、同一 ST でも異なる PFGE 像を示すことは多い。全体の傾向や変化を知る上で SBT 法は有用だが、個別の事案には PFGE が欠かせないことは言うまでもない。

表 1 2011 年度に収集した臨床分離株 (45 株)

NIBS 分離 番号 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)										同じ ST の報告があるか 2012 年 12 月時点
					flaA	pilE	asd	mip	tompC	proA	neuA				
2750	2011	男	土木作業現場 (推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	384	2	3	9	10	2	1	10	国内 8 例目	
2751	2011	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	国内 13 例目、国外	
2752	2011	男	不明 (工務店勤務、庭で草花の植替え)	<i>L. pneumophila</i>	1	1023	21	27	28	12	15	29	6	無	
2756	2011	女	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	国内 12 例目	
2757	2011	男	畑仕事 (推定)	<i>L. pneumophila</i>	3	93	3	10	1	28	14	9	13	国外多、県内 6 例目	
2758	2011	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	2	354	3	5	1	7	14	32	8	国内 3 例目、国外 1 例 (全て SG2)	
2759	2011	女	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1077	3	6	1	1	14	11	1	無	
2762	2008	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	国内 11 例目、国外	
2763	2008	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	国内 12 例目、国外	
2764	2011	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1078	7	6	17	20	13	11	6	無	
2775	2011	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1076	6	10	2	3	9	4	9	無	
2776	2011	女	家庭菜園 (推定)	<i>L. pneumophila</i>	3	93	3	10	1	28	14	9	13	国外多、県内 7 例目	
2777	2011	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	国内 12 例目、国外	
2778	2011	男	不明 (デイサービスの浴槽水からは検出されず)	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	国内 13 例目、国外	
2779	2011	男	畑 (推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	国内 14 例目、国外	
2780	2011	男	温泉 (推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	1159	3	13	52	10	14	9	11	無	
2784	2011	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	256	6	10	14	5	39	14	9	国外	
2785	2011	男	エアコン (推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	1077	3	6	1	1	14	11	1	2 例目 (同県)	
2786	2011	男	温泉 (推定、宿泊施設温泉水からはレジオネラ属菌不検出)	<i>L. pneumophila</i>	1	644	6	10	20	10	9	14	11	国内 3 例目	
2787	2011	男	銭湯 (推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	国内 14 例目、国外	
2788	2011	女	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1135	10	22	7	3	35	18	6	無	
2789	2011	女	津波による溺水 (推定)	<i>L. pneumophila</i>	9	1136	6	10	23	28	18	14	6	無	
2790	2011	女	津波による溺水 (推定、2789 と同一患者)	<i>L. pneumophila</i>	UT	1136	6	10	23	28	18	14	6	無 (NIBS2789 と同じ)	
2791	2011	女	津波による溺水 (推定、2789 と同一患者)	<i>L. pneumophila</i>	6	68	3	13	1	28	14	9	3	国外	
2792	2011	女	津波による溺水 (推定、2789 と同一患者)	<i>L. pneumophila</i>	1	1139	2	10	23	10	18	14	6	無	
2793	2011	男	浴槽水 (水道水、推定、旅館に宿泊しながら仮設住宅建設に従事)	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	国内 13 例目	
2794	2011	男	浴槽水 (温泉入浴施設、推定、PFGE 一致せず)	<i>L. pneumophila</i>	1	62	8	10	3	15	18	1	6	国内 2 例目、国外多	
2800	2011	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	国内 15 例目、国外	
2835	2011	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1077	3	6	1	1	14	11	1	3 例目 (同県)	
2836	2011	男	温泉 (デイケア、推定)	<i>L. pneumophila</i>	1	131	6	10	21	13	17	14	11	国内 3 例目	
2837	2011	男	不明 (夏はシャワーのみ)	<i>L. pneumophila</i>	1	353	8	10	6	15	51	1	6	国内 3 例目	
2838	2011	男	温泉 (集団感染、スポーツジム)	<i>L. pneumophila</i>	1	256	6	10	14	5	39	14	9	国内 2 例目、国外	
2839	2011	男	スパ、サウナ (推定、菌不分離)	<i>L. pneumophila</i>	1	36	3	4	1	1	14	9	1	国内 2 例目、国外	
2842	2011	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1295	6	3	9	10	2	1	6	無	
2853	2012	男	院内感染 (推定、ICU 入院患者)	<i>L. pneumophila</i>	1	42	4	7	11	3	11	12	9	国内 6 例目、国外	
2857	2012	男	温泉 (入浴施設、長湯して意識不明、2858-2860 と同一患者)	<i>L. pneumophila</i>	1	89	4	10	11	15	29	1	6	国内 2 例目、国外	
2858	2012	男	温泉 (入浴施設、長湯して意識不明、2857、2859、2860 と同一患者)	<i>L. pneumophila</i>	1	530	6	10	20	6	9	4	9	国内 2 例目	
2859	2012	男	温泉 (入浴施設、長湯して意識不明、2857、2858、2860 と同一患者)	<i>L. pneumophila</i>	1	1209	6	10	15	47	9	14	11	無	
2860	2012	男	温泉 (入浴施設、長湯して意識不明、2857-2859 と同一患者)	<i>L. pneumophila</i>	1	1119	2	10	14	10	21	4	3	国外 1 例 (環境)	
2864	2011	女	不明	<i>L. pneumophila</i>	1	1210	8	19	5	12	18	5	6	無	
2865	2012	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	12	68	3	13	1	28	14	9	3	国内 2 例目、国外 (SG6, 12)	
2866	2012	女	浴槽水 (フィットネススクラブの温泉)	<i>L. pneumophila</i>	1	1211	2	3	9	30	2	1	6	無	
2867	2012	男	浴槽水 (温泉、溺水、2868 と同一患者)	<i>L. pneumophila</i>	1	1212	2	10	17	14	21	14	11	無	
2868	2012	男	浴槽水 (温泉、溺水、2867 と同一患者)	<i>L. pneumophila</i>	6	537	3	13	1	28	12	9	3	国内 3 例目	
2877	2011	男	温泉 (宿泊施設、18,000CFU/100mL)	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	国内 14 例目	

表 2 *L. pneumophila* 血清群 1 環境分離株の遺伝子型別 (38 株)

NIIB番号	由来	由来	検体採取日	CFU	ST	flaA	pilE	asd	mip	mompS	praA	neuA	ST備考
NIIB2709	冷却塔水	新潟市	2006.6.30	180	986	1	14	16	16	15	13	2	新規遺伝子型
NIIB2710	冷却塔水	新潟市	2006.7.26	400	986	1	14	16	16	15	13	2	新規遺伝子型
NIIB2711	冷却塔水	新潟市	2006.8.8	560	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数
NIIB2712	冷却塔水	新潟市	2007.8.3	1000	1008	1	4	3	1	1	41	1	新規遺伝子型
NIIB2713	冷却塔水	新潟市	2007.8.3	980	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数。日本では特に冷却塔水
NIIB2714	冷却塔水	新潟市	2007.10.12	12000	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数。日本では特に冷却塔水
NIIB2715	冷却塔水	新潟市	2008.7.22	40	48	5	2	22	27	6	10	12	土壌最多、冷却塔水1、温泉水1、浴槽水(水道水)1(以上国内)。ヨーロッパでは臨床、環境有り
NIIB2716	冷却塔水	新潟市	2008.8.11	280	1008	1	4	3	1	1	41	1	新規遺伝子型
NIIB2717	冷却塔水	新潟市	2008.8.11	20	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数。日本では特に冷却塔水
NIIB2718	冷却塔水	新潟市	2008.8.12	2800	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数。日本では特に冷却塔水
NIIB2765	冷却塔水	福岡市	2000.6.7		739	12	8	11	2	10	12	2	国内臨床1株、環境2株
NIIB2740	冷却塔補給水(水道水)	東京都	2010.8.23	55	1385	6	21	33	19	41	1	1	新規遺伝子型
NIIB2686	冷却塔水(患者関連、一致せず)	福岡市	2010.10.6		1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数。日本では特に冷却塔水
NIIB2845	シャワー水	茨城県	2011.10.25	20	1008	1	4	3	1	1	41	1	国内冷却塔
NIIB2848	シャワー水	茨城県	2011.9.27	310	256	6	10	14	5	39	14	9	国内臨床1、国外臨床多
NIIB2850	シャワー水	茨城県	2011.9.30	20	22	2	3	6	10	2	1	6	国外臨床環境、国内土壌
NIIB2726	加湿器(拭取り、患者関連、一致)	新潟市	2010.10.9	560	353	8	10	6	15	51	1	6	臨床4(国内のみ、感染源加湿器1以外はすべて感染源不明)
NIIB2840	加湿器	神奈川県			1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数。日本では特に冷却塔水
NIIB2719	浴槽水	新潟市	2006.11.22	1500	138	10	12	7	3	16	18	6	国内臨床多(不明1例除き、感染源は浴槽水と推定あるいは確定)、国内環境(温泉)
NIIB2720	浴槽水	新潟市	2006.11.28	600	566	6	10	20	13	21	14	11	国内臨床2
NIIB2721	浴槽水	新潟市	2006.12.4	30	566	6	10	20	13	21	14	11	国内臨床2
NIIB2723	浴槽水	新潟市	2008.7.8	280	129	6	6	15	28	4	14	11	温泉3、土壌2、臨床1、国内
NIIB2724	浴槽水	新潟市	2008.7.8	290	127	3	13	1	10	14	9	11	温泉1、国内
NIIB2760	浴槽水(水道水)	文京区	2011.7.7	30	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数。日本では特に冷却塔水
NIIB2907	浴槽水	文京区	2012.7.13	10	1290	2	14	16	10	15	13	11	新規遺伝子型
NIIB2910	浴槽水	文京区	2012.8.3	20	1151	7	43	31	3	48	15	40	国内環境1(浴槽水)
NIIB2729	浴槽拭取り	文京区	2010.12	40	128	7	6	17	3	14	11	11	国内外環境各1
NIIB2584	浴槽水(患者宅、一致)	和歌山市	2010.2.16	60	59	7	6	17	3	13	11	11	国外臨床、環境多数。国内臨床2(当該事例含)
NIIB2547	浴槽水(患者関連、一致せず)	和歌山市	2009.3.24	10	1	1	4	3	1	1	1	1	国内外の臨床、環境で多数。日本では特に冷却塔水
NIIB2597	浴槽水(患者関連、一致せず)	群馬県	2010.2.16		59	7	6	17	3	13	11	11	国外臨床、環境多数。国内臨床2
NIIB2799	浴槽水(患者関連、一致せず)	岩手県	2011.11.15	70	138	10	12	7	3	16	18	6	国内臨床多(不明2例除き、感染源は浴槽水と推定あるいは確定)、国内環境(温泉)
NIIB2722	浴槽水(患者関連、一致)	新潟市	2006.12.12	90	89	4	10	11	15	29	1	6	国内臨床1(当該事例)、温泉1。欧米で患者、環境から
NIIB2795	浴槽水(患者関連、一致)	岩手県	2011.5.24	17000	138	10	12	7	3	16	18	6	国内臨床多(不明1例除き、感染源は浴槽水と推定あるいは確定)、国内環境(温泉)
NIIB2854	浴槽水(患者関連、一致)	鳥取県	2012.1.17		530	6	10	20	6	9	4	9	国内臨床1
NIIB2856	浴槽水(患者関連、一致)	鳥取県	2012.1.17		1209	6	10	15	47	9	14	11	新規遺伝子型
NIIB2869	浴槽水(患者関連、一致)	福岡県	2012.2.23	3900	212	2	10	17	14	21	14	11	国内臨床1(当該事例)
NIIB2929	浴槽ろ過器ろ材(患者関連、一致)	兵庫県	2012.7.6		138	10	12	7	3	16	18	6	国内臨床多(不明1例除き、感染源は浴槽水と推定あるいは確定)、国内環境(温泉)
NIIB2626	風呂湯炊口拭取り(患者宅、一致)	新潟市	2008.8.6		612	2	6	17	14	8	8	9	国内臨床1(当該事例)

E. 結論

L. pneumophila 臨床床分離株 45 株 (実際の分離年は 2008 年に分離された 2 株以外は 2011 年 2 月から 2012 年 2 月まで) および、*L. pneumophila* 血清群 1 環境分離株 38 株 (冷却塔関連株 13 株、シャワー水 3 株、加湿器 2 株、浴槽関連株 20 株) について遺伝子型別を行った。SBT 法の疫学的有用性が確認できるとともに、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縣邦雄・井上浩章 (アクアス株式会社)、磯部

順子・金谷潤一 (富山県衛生研究所)、猪又明子 (東京都健康安全研究センター)、岩渕香織 (岩手県環境保健研究センター)、江川武・佐々木林子 (文京保健所)、北川恵美子 (石川県保健環境センター)、小倉恵美 (柏市保健所)、勝川千尋 (大阪府立公衆衛生研究所)、金澤祐子 (和歌山市衛生研究所)、北橋智子 (千葉市環境保健研究所)、黒澤肇 (群馬県衛生環境研究所)、小嶋由香 (川崎市衛生研究所)、清水 寧 (北九州市環境科学研究所)、白田忠雄 (茨城県衛生研究所)、瀬戸順次・鈴木裕 (山形県衛生研究所)、辻英高 (兵庫県立健康環境科学研究所)、富田隆弘 (千葉県衛生研究所)、中嶋 洋 (岡山県環境保健センター)、花原悠太郎 (鳥取県衛生環境研究所)、村上光一 (福岡県保健

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)、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) 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

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhashi K, Chang B, Murai M, Ichinose M, Ohnishi M, Kura F; Working Group for *Legionella* in Japan. 2012. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. Appl Environ Microbiol. 12:4263-70.
- 2) 市原祥子・江藤良樹・濱崎光宏・村上光一・竹中重幸・堀川和美、西原千鶴子、荒牧明世、前川純子:患者及び浴場施設検体から複数血清群の *Legionella pneumophila* が分離された事例について。2012. 福岡県保健環境研究所年報第39号(印刷中)。

2. 学会発表

- 1) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura, Hiroyuki Tawara, Yuko Watanabe, Junko Isobe, Shinobu Tanaka, Hiroshi Nakajima Shuji Yoshino, Shinjiro Abe, Takako Misaki, Tomoe Shimada, Taku Wakui, Yuki Tada, Makoto Ohnishi. Grouping of clinical isolates of *Legionella pneumophila* SG1 in Japan, using SBT analysis and environmental habitats. ESGLI 2012 (1st Meeting of the ESCMID Study Group for *Legionella* Infections), Dresden, Germany, Sep. 2012.

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）

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、昨年に引き続き水溜まり 65 検体、車のウオッシャー液(106 検体)について、また、新たに河川水 2 検体、公衆浴場で使用されているシャワー水(18 件)について調査を実施した。その結果、水溜まりから 21/65 (32.3%)、ウオッシャー液からは 3/106 (2.8%)、シャワー水からは 7/18 (38.9%) の *Legionella* 属菌が分離された。河川水 2 件からはレジオネラ属菌は分離されなかった。水溜まりから分離された *Legionella* 属菌では *L. pneumophila* SG1 がおよそ 26.3%と多く、それらのうち 50.0%が *lag-1* 遺伝子保有株であった。ウオッシャー液から分離されたのは *L. pneumophila* SG5 が 3 株のみであったが、シャワー水からは SG1 に加え、SG3, 4, 5, 6, 8, 9, UT が分離された。2 施設のシャワー水から分離された *L. pneumophila* SG1 は *lag-1* 遺伝子を保有していなかった。しかしながら、シャワー水はミストが多く、それを原因とするレジオネラ症患者も発生しており、注意喚起が必要である。また、ウオッシャー液からは *L. pneumophila* SG1 は分離されなかったものの、レジオネラ属菌が検出されたことから、レジオネラ症の感染源となりうることを示された。水溜りやウオッシャー液のように、感染源となりうる環境を見つけるため、更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、尿中抗原検査の保険適用などの影響により全国的に報告数が増加傾向にある¹⁾が、感染様式や起因菌であるレジオネラ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、富山県では平成 18～23 年の 6 年間の対人口 10 万人の報告数は全国でもっとも多かった。これまでの調査によると、レジオネラ症患者発生数は地域（東西）で著しい差が認められた。一方、感染

源については患者の行動様式や職業などから、およそ 4 割は浴用水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が明らかとなった（図 1）。

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^{2,3)}から、調査対象を道路上の水溜まりと関連地域の河川水、また、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と、近年、レジオネラ症の感染源として報告された浴場のシャワー水を選んだ。

2. 調査期間と試料

水溜まりについては平成23年12月～平成24年8月の9か月間に県内の幹線道路で、昨年と同じ6地点と、今年度新たに設定した20地点(図1)で採取した65検体について、また、車のウオッシャー液については、平成24年7月～平成24年11月の間に採取した106検体である。シャワー水については、浴用水の検査時に同時に採取した。ただし、シャワー水は約1分間流出させた後、容器に採取した。河川水は、*L. pneumophila* SG1のSequence Type (ST) 505が分離された浴用施設と、地理的に近い位置を流れる河川の水を2回採取した。

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150ml、ウオッシャー液100ml、シャワー水および河川水200mlをメンブランフィルター(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。ただし、ウオッシャー液については、ろ過に長時間かかったため、後半の42検体についてはフィルター口径を0.45 μ mに変更した。

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 $^{\circ}$ 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⁴⁾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 22株について、*lag-1* 遺伝子の保有率を調べた。Kozakらの報告⁵⁾したプライマー*lag-F*：5'-CTCACAACAAGTCA AGCAAC-3'および*lag-R*：5'-AAACCATAC CAAA GCAACAT-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2 μ l、テンプレート1 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 $^{\circ}$ C2分、94 $^{\circ}$ C30秒、57 $^{\circ}$ C30秒、72 $^{\circ}$ C1分を30サイクル、72 $^{\circ}$ C5分でthermal cycler DICE(TaKaRa)でおこなった。

⑤SBT：*lag-1* 遺伝子の調査と同様、*L. pneumophila* SG1 22株について、Sequence Type (ST)を決定した。方法は前川の報告に準じて行なった⁶⁾。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、MEGA4 Softwareを用いてNeighbor-joining法で系統樹を作成した。

⑥PCRによるレジオネラ属菌の遺伝子検出

ウオッシャー液について、PCR を用いて 16S rRNA 遺伝子⁷⁾及び *mip* 遺伝子⁸⁾を調べた。検体数はそれぞれ 93 検体、63 検体であった。

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：地点ごとの検出状況を図 2 に示した。

Legionella 属菌の検出率は、全体で 21/65 (32.3%) で (表 1)、昨年度の検出率 (47.8%) よりも低かった。また、水溜りの *Legionella* 属菌は 10~99cfu/100ml あたりとなった検体が 16/33 (48.5%) 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。東部 (富山市, 上市町, 滑川市, 立山町, 魚津市, 黒部市, 入善町) の検出率は 40.0% (10/25 検体) であり、西部 (射水市, 高岡市, 氷見市, 小矢部市, 砺波市, 南砺市) の検出率は 27.5% (11/40 検体) 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 76 株の血清群別の結果を図 3 に示した。UT を除き、もっとも多かったのは *L. pneumophila* SG1 20 株 (26.3%) で、ついで SG8 が 13 株 (17.1%), SG5 が 11 株 (14.5%) の順であった。

③*L. pneumophila* SG1 の ST 及び *lag-1* 遺伝子保有状況：20 株の ST 及び *lag-1* 遺伝子保有状況を表 2 に示した。6 種類の ST (ST22, ST48, ST120, ST132, ST1193, ST1204) は昨年度も水溜りから検出されたが、採水地点は異なっていた。また、昨年度も採水した地点から、昨年度は検出されなかった 5 種類の ST が検出された (表 3)。*lag-1* 遺伝子を保有していたのは 10/20 株

(50.0%) であった (表 2)。

2. 車のウオッシャー液の *Legionella* 属菌の汚染状況

調査したウオッシャー液 106 検体中、*Legionella* 属菌が分離されたのは 3 検体 (2.8%) で、その菌数はそれぞれ 10cfu/100ml、20cfu/100ml、110cfu/100ml であった。また、分離された *Legionella* 属菌の血清群はすべてが *L. pneumophila* SG5 であった。濃縮液中の遺伝子の保有率は、16S rRNA 遺伝子は 51/93 検体 (54.8%), *mip* 遺伝子は 63 検体がすべてから検出されなかった (表 4)。

3. 河川水からの *Legionella* 属菌の汚染状況

採水した 2 検体から *Legionella* 属菌は検出されなかった。

4. シャワー水からの *Legionella* 属菌の汚染状況

調査したシャワー水 18 検体中、*Legionella* 属菌が分離されたのは 7 検体 (38.9%) で、10~99cfu/100ml が 3 検体、100~999cfu/100ml が 4 検体であった。血清群別の陽性施設数を図 4 に示した。2 施設から *L. pneumophila* SG1 が検出されたが、*lag-1* 遺伝子は保有していなかった。

5. *L. pneumophila* SG1 の SBT の系統樹解析

今年度分離株と当所保存株の *L. pneumophila* SG1 計 169 株 (水溜り由来 82 株, 浴用施設由来 53 株, シャワー水由来 3 株, 冷却塔由来 5 株, レジオネラ症患者由来 26 株) について、SBT の系統樹を作成した (図 5)。

患者由来 26 株のうち、8 株は浴用施設由来株と同じ ST であった一方、9 株は水溜り

由来株と同じ ST であった。疫学調査で浴用施設を利用していた患者由来 13 株のうち、6 株は浴用施設由来株と同じ ST で、3 株は水溜り由来株と同じ ST 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 20~30 名で、平成 24 年においても、人口対 10 万人報告数 2.16 で、全国でもっとも多かった。

富山県は人口当たりの患者は西部の方が多いため、そこで今年度は、水溜りの検出率に東西で有意差があるかを明らかにするため、昨年度より採水地点を増やして調査したが、水溜りの *Legionella* 属菌検出率は東西で有意な差はなかった。また、昨年度と同じ ST の株が昨年度とは異なる地点から分離されたことから、ST に地域による差は認められなかった。

水溜りから分離された *Legionella* 属菌は、昨年度と同様に SG1 がもっとも多く、半数が *lag-1* 遺伝子を保有していたことから、依然として水溜りが感染源となりうる結果であった。分子系統樹の結果においても、昨年度と同様に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った。

疫学調査で浴用施設を利用していた患者由来 3 株は、水溜り由来株と同じ ST であった。これまで、これらの患者の感染源は浴用施設であると推定されていたが、今回の結果から水溜りとの関連が示唆された。あるいは、土壌から同じ ST の株が水溜まりと浴用設備を汚染したのかもしれない。従って、患者の感染源を特定するためには、浴用施設以外の詳細な疫学調査に加え、患者や患者と関連のありうる様々な環境から菌を分離し、遺伝子型を比較することが重要である。

ウオッシャー液については、近年 Wallensten²⁾ や Palmer⁹⁾ が新しいレジオネラ症の感染源のひとつとなりうることを指摘した。これらの報告では患者発生とウインドウウオッシャー液に界面活性剤を使用していないことを関連付けており、また、界面活性剤を使用していないウオッシャー液で細菌数が多く、1 検体から *L. pneumophila* SG1 を分離したと報告している。本研究でも *L. pneumophila* SG5 が分離され、ウオッシャー液がレジオネラ属菌の生息環境のひとつとなることが示された。調査の中で、協力者の一部は界面活性剤の使用に対する認識もなく、ウオッシャー液のタンクの位置さえ知らないという状況が認められた。ウオッシャー液のリスクとともに界面活性剤を適切な濃度で使用するよう周知する必要が示された。

シャワー水については、*lag-1* 遺伝子を保有する *L. pneumophila* SG1 は分離されなかったが、レジオネラ属菌はおよそ 4 割から分離されており、注意が必要である。とりわけミストが多く発生し、感染しやすい状況となることから、重要な感染源のひとつ

つとして認識しなければならない。すでにこれを原因とする患者発生について報告¹⁰⁾され、その後の調査から、毎日の塩素の添加、週1回以上の高濃度塩素による消毒、シャワーヘッドの消毒、年1回以上の調節箱を含むシャワー系統の配管洗浄、水質検査の実施等、浴槽水同様に、日常の衛生管理が重要であると指摘している。しかしながら、現在の関係法令ではシャワー水の水質基準や衛生管理について規定されていない。したがって、シャワー水に関するこれらが規定されるとともに、清掃、管理についても、適切な指導方法が示されるよう強く望む。

環境中には広くレジオネラ属菌が生息することが改めて示された。さらに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) National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare. 2008. レジオネラ症 2003.1~2008.9. Infect Agents Surveill Rep. 29:327-328.
- 2) Sakamoto *et al.*, 2009. *Legionella pneumophila* in Rainwater on Roads. Emerg. Infect. Dis. 15:1295-1297.
- 3) Wallensten *et al.*, 2010. Windscreen wiper fluid without added screenwash in motor vehicles: a newly identified risk

factor for Legionnaires' disease. Eur. J. Epidemiol. 25:661-665.

4) 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. 日本環境感染誌 25 (8) :8-14.

5) Kozak *et al.*, 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. 47:2525-2535.

6) Amemura-Maekawa *et al.*, 2010. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. J. Med. Microbiol. 59: 653-659.

7) Yamamoto H. 1992. Detection and identification of *Legionella* species by PCR. Nihon Rinsho. 50:394-9. (In Japanese.)

8) Mahbubani *et al.*, 1990. Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. Mol. Cell Probes. 4:175-87.

9) Palmer *et al.*, 2012. *Legionella pneumophila* found in windscreen washer fluid without added screenwash. Eur. J. Epidemiol. 27:667.

10) National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare. 2010. シャワー水を感染源としたレジオネラ症例について. 31:331-333.

F. 研究発表

Kanatani *et al.* Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group

of clinical isolates in Toyama Prefecture, Japan. J Infect Chemother. In press 2013.

G.知的財産権の出願・登録状況
なし

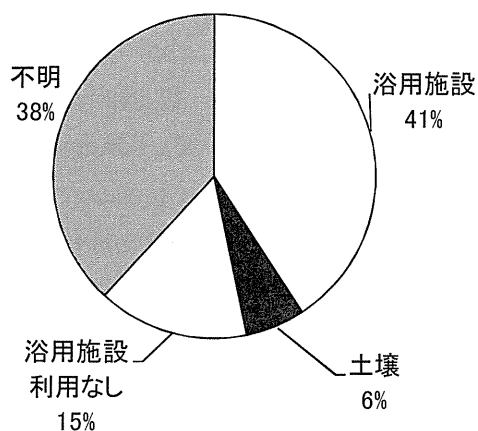


図1 レジオネラ症患者の感染源調査（推定）計 155 人
（1999年～2011年、富山県内）

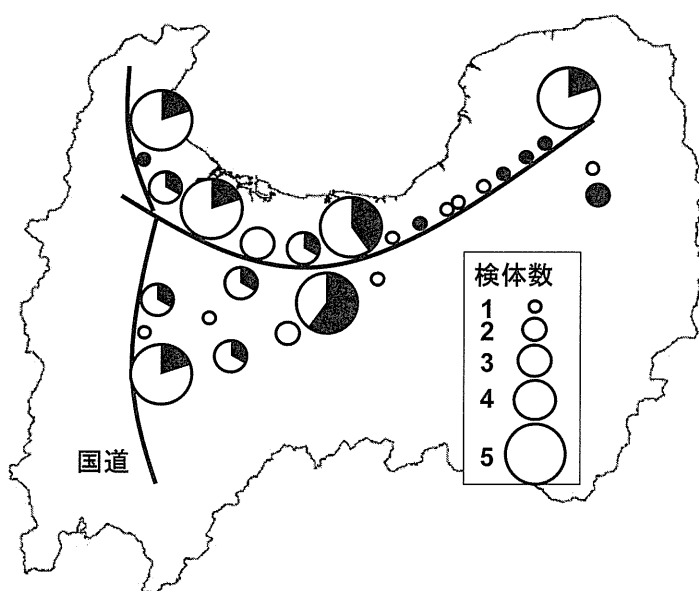


図2 水溜まり調査地点とレジオネラ属菌分離率

表1 水溜まりのレジオネラ属菌数

菌数	検体数	%
10未満	11	61.1
10-99	3	16.7
100-999	4	22.2
合計	18	100

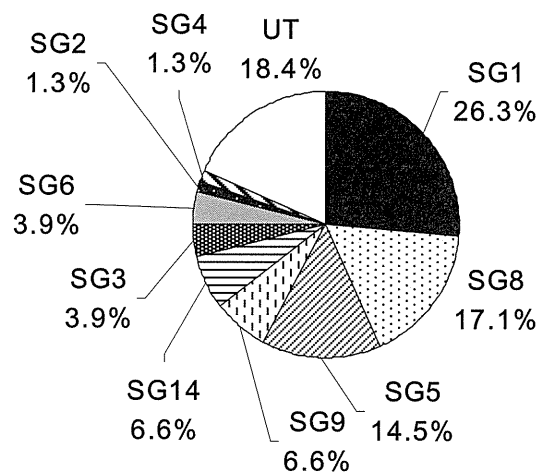


図3 水溜まり由来レジオネラ属菌の血清群別

表2 水溜まりから分離された *L.pneumophila* SG1 の ST と *lag-1* 保有状況

ST	株数	<i>lag-1</i> gene positive
89	3	3
493	3	0
1193	3	1
22	1	0
48	1	1
120	1	1
132	1	1
922	1	1
1204	1	0
1205	1	1
1224	1	1
1266	1	0
1295	1	0
1364	1	0
合計	20	10

表3 水溜まりから分離された *L.pneumophila* SG1
の地点別 ST 一覧 (H23~H24)

東部	ST	H23	H24	西部	ST	H23	H24	
富山地区	22	0	1	高岡地区	48	1	0	
	23	1	0		132	1	0	
	48	3	0		493	0	1	
	75	1	0		507	1	0	
	118	1	0		610	1	0	
	120	1	1		1196	1	0	
	127	1	0		1203	1	0	
	132	1	0		1204	2	0	
	384	1	0		1295	0	1	
	507	1	0		小計	8	2	
	615	1	0		氷見地区	48	1	1
	808	1	0			120	2	0
	922	0	1			132	0	1
	1186	2	0	808		1	0	
	1187	2	0	384		1	0	
	1189	1	0	1194		1	0	
	1192	1	0	小計		6	2	
	1193	2	1	射水地区	89	1	3	
	1197	1	0		120	2	0	
	1198	1	0		624	1	0	
1199	1	0	876		1	0		
1200	1	0	1190		1	0		
1204	1	0	1191		1	0		
1205	0	3	1195		1	0		
1364	0	1	1202		1	0		
小計		26	8	1224	0	1		
黒部地区	22	1	0	1266	0	1		
	23	2	0	小計	9	5		
	48	2	0					
	120	2	0					
	493	0	2					
	507	1	0					
	1188	1	0					
	1198	1	0					
	1201	1	0					
	1204	1	1					
1225	1	0						
小計		13	3					
計		39	11	計		23	9	

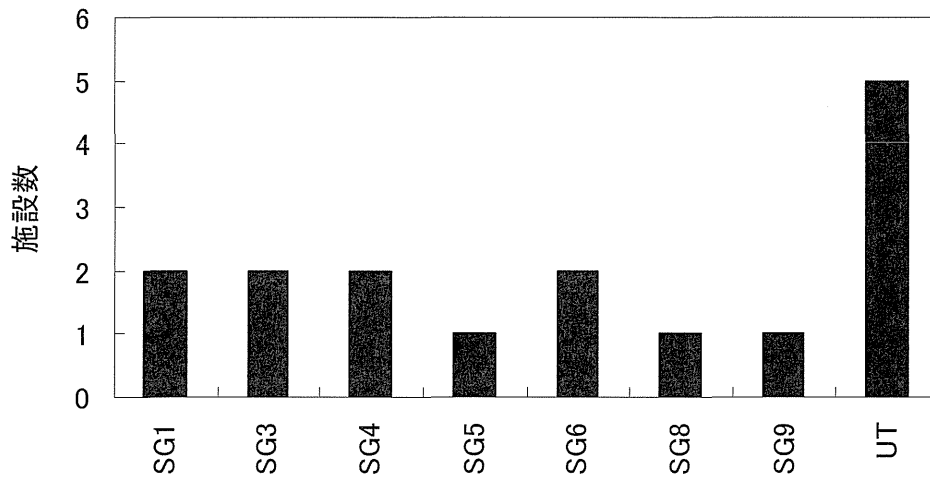


図4 シャワー施設におけるレジオネラ属菌の血清群別の陽性施設数

表4 ウインドウウォッシャー液からのレジオネラ属菌検出状況

施設	検体数	レジオネラ属菌 陽性数	16S rDNA 陽性率	<i>mip</i> 遺伝子 陽性率	分離菌名
A	23	0	11/16	0/1	
B	9	0	3/8		
C	18	0	2/7		
D/E	48	3	26/48	0/48	<i>L. pneumophila</i> SG5 (3)
F	14	0	9/14	0/14	