

図5 *L.pneumophila* SG1 の SBT 塩基配列の分子系統樹

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

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 24 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*(Lp)のうち、血清群(SG)3 の株は平成 20 年～24 年までに 8 株あり、これらすべての株が、sequence-based typing (SBT) 法による型別で sequence type (ST) 93 に型別され、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法でも同じパターンを示した。これらの患者の感染源あるいは原因菌は同一である能性が示唆されたので、感染源究明のため Lp SG3 の環境中での分布を調査した。浴槽水等 101 検体を調査した結果、13 検体(12.9%)からレジオネラが検出され、LP SG3 は浴槽水 2 検体のみから検出された。一方、浴槽水等から分離されたレジオネラ 133 株を収集し血清型別を実施した結果、Lp SG3 は浴槽水由来の 29 株、原水由来の 6 株、プール水由来の 10 株およびフローミル水由来の 9 株の計 54 株であった。このうちの 42 株と、当センターで分離した浴槽水由来の 2 株の計 44 株について PFGE 法を行って、患者株の PFGE パターンと比較した。PFGE パターンは 14 パターンに分類されが、患者株と同じパターンを示す株はなかった。今後さらに調査を継続して、感染源を究明していく必要がある。

### A.研究目的

岡山県では、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いる。患者由来株は平成 19 年より収集しているが、平成 20 年から *L.pneumophila* (以下、Lp) 血清群(以下、SG) 3 の菌株が多数分離されている<sup>1)</sup>。国立感染症研究所で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。このような地域特異的な菌の感染源究明のため、汚染実態調査を開始した。

### B.研究方法

#### (1)材料

平成 24 年度に採水した浴槽水等 101 検体について、レジオネラの検査を実施した。また、保健所等が分離したレジオネラ 133 株を収集し、同定および血清型別を実施した。これらのうち、Lp SG3 と同定された株 44 株と患者由来 Lp SG3 株 8 株について分子疫学解析を行い、比較した。

#### (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 (以下、SBT) 法による型別は国立感染症研究所で実施し、sequence type (以下、ST)を決定した。パルスフィールドゲル電気泳動(以下、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特定ができないように、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 101 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 13 検体(12.9%)から検出され、浴槽水 9.0%、原水 33.3%、冷却塔水 83.3%検出されたが、プール水やその他の環境由来の水からは検出されなかった。検出されたレジオネラは、浴槽水および原水では Lp SG1、2、3、5、6、10 とその他のレジオネラ属菌、冷却塔水は Lp SG1、13 とその他のレジオネラ属菌であった。

県内の保健所等が分離したレジオネラ菌株を収集し、血清群別を実施した結果を、表 2 に示した。収集したレジオネラ菌株は 133 株で、浴槽水、原水、プール水、フローミル水および冷却塔水由来株である。収集したレジオネラの菌種と血清群は、浴槽水は Lp SG1、2、3、5、6、8、9、10、12、型別不能と他のレジオネラ属菌、原水は Lp SG1 および 3、プール水とフローミル水は Lp SG3、冷却塔水は Lp SG1、13 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。平成 24 年度は Lp SG1 が 1 株、SG3 が 1 株、SG10 が 1 株で、すべてのレジオネラ菌株が Lp であった。血清群別では、SG1 が 16 株、SG2 が 1 株、SG3 が 8 株、SG10 が 1 株であった。患者の症状は、SG1 の株に感染した患者では、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、SG3 の感染患者では、胸部異常影が観察されてはいるが、比較的軽微な症状の軽いケースが多かった。また、糖尿病を基礎疾患に持つ患者の感染では、死亡例が見られた。患者株を SBT 法により解析した結果、SG1 の株は多種類の ST に分類され、ST1077 の 3 株は国内で始めて分離された株であった。SG3 の 8 株はすべてが ST93 に型別され、このうち 7 株では PFGE パターンも同一であった(1 株は未実施)。

Lp SG 3 に感染した患者の感染源究明のため、浴槽水等から分離した Lp SG3 株と患者由来株との関連性を、PFGE 法により検討した。その結果を表 4 および図 1 に示した。

浴槽水等由来株 44 株の PFGE パターンは 14 パターンに分類され、同時期に同一施設の複数の検体から分離された株同士は、同じ PFGE パターンを示す傾向が見られた。一方、これら 44 株の PFGE パターンは、すべて患者由来株のパターンと異なっていた。

### D.考察

県内では、平成 24 年に 29 名のレジオネラ症患者が報告されており、原因菌は Lp

SG1 が最も多い。多くの場合、尿中抗原検査により診断を行っているため、原因菌は分離されず、感染源究明が困難な状況である。当センターでは、レジオネラレファレンスセンター活動の一環として、平成19年より病院の検査室で分離されたレジオネラ症患者由来株の収集を始めた(表3)。収集した患者由来株に特徴的なことは、すべての株が Lp であり、SG1(16株)が最も検出頻度が高かった。次いで SG3(8株)が多く検出されたが、これら2種類のレジオネラについて患者の症状を比較すると、SG1の患者は症状が厳しく重症例が多いのに対して、SG3の場合は比較的軽微な傾向が見られた。これは、呼吸器内科を受診した患者すべてについて、病院独自でレジオネラの検査を実施しているため、特に比較的軽微な SG3 株でも検出できたものと思われる。

患者株の分子疫学的解析の結果、Lp SG1の菌株は多種類のSTに型別され、このうちST609とST1077は3株ずつあった。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るが、ST609は当県以外では、鳥取県の冷却塔水から1株検出されているのみで、ST1077については、今まで国内で確認されていない新規遺伝子型であり、平成23年度にはじめて分離されたものである。今後、両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。Lp SG3の8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Lp SG3、ST93株についても、上記Lp SG1、ST609および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

おり、県内に特有の感染源が存在する可能性が考えられる。これらのことから、患者検体についてはより積極的なレジオネラの菌分離を行って原因菌を検出することが、本菌感染症の疫学解析を行う上で必要である。さらに、当県の環境中におけるLp SG1、ST609、ST1077およびLp SG3、ST93を主にしたレジオネラの汚染実態調査を継続して、環境中でのレジオネラの分布を把握し、患者の感染源究明や感染予防、感染拡大防止に役立てることが重要であると考えられる。

なお、本調査にご協力いただきました岡山市保健所、倉敷市保健所および岡山県健康づくり財団の関係者各位、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) 平成24年度に、県内のレジオネラ症散発患者3名から *L.pneumophila* が分離された。
- 2) これらの株の血清群は、1、3、10が各1株であった。
- 3) 血清群3の8株はすべて同じST93であり、PFGEを実施した7株すべてのパターンも一致した。
- 4) 浴槽水等由来Lp SG3株44株のPFGEパターンは、すべて患者由来株のパターンと異なっていた。

## F. 参考文献

- 1) 西山 明宏、石田 直、興梶 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.

G.研究発表  
なし

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 :  
333-334.

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(平成 24 年度)

検体名	検体数	陽性検体数(%)	菌種	血清群	株数
浴槽水	67	6(9.0)	<i>L.pneumophila</i>	2	1
				3	2
				5	2
				6	2
				10	2
			<i>Legionella spp.</i>		1
原水	6	2(33.3)	<i>L.pneumophila</i>	1	1
				6	1
プール水	7	0			
冷却塔水	6	5(83.3)	<i>L.pneumophila</i>	1	3
				13	1
			<i>Legionella spp.</i>		1
下水処理場 合流水	3	0			
水たまりの水	1	0			
池水	3	0			
堀水	1	0			
患者宅付近の 用水の水	4	0			
ホテル内の 噴水の水	1	0			
谷川水	1	0			
湧水	1	0			
計	101	13(12.9)			17

表 2 保健所等から収集したレジオネラ株(平成 24 年度)

検体名	菌種	血清群	株数
浴槽水	<i>L.pneumophila</i>	1	12
		2	4
		3	29
		5	4
		6	27
		8	1
		9	7
		10	10
		12	1
		UT	1
	<i>Legionella spp.</i>		1
原水	<i>L.pneumophila</i>	1	1
		3	6
プール水	<i>L.pneumophila</i>	3	10
フローミル水	<i>L.pneumophila</i>	3	9
冷却塔水	<i>L.pneumophila</i>	1	9
		13	1
計			133

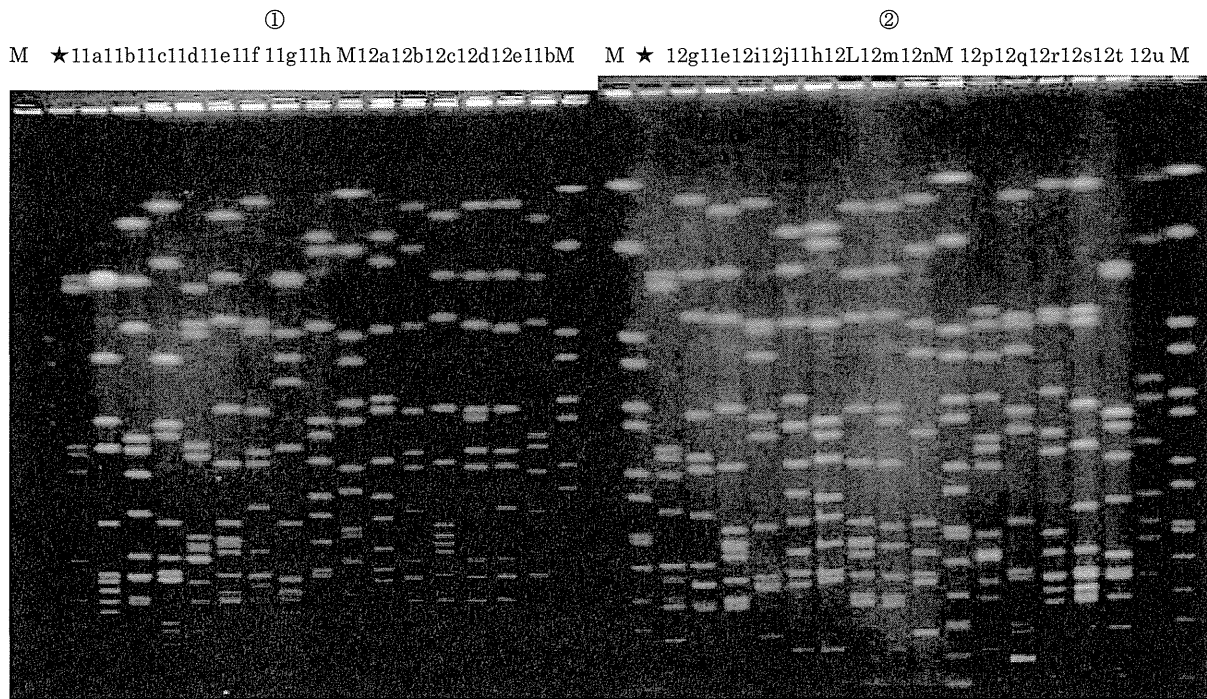
表 3 患者由来レジオネラ株

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	120		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
23	55	男	2012.02	1	42		発熱、呼吸困難、肺炎
26	71	男	2012.11	1	530	呼吸困難、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	同一	胸部異常影、症状無し
18	79	男	2008.08	3	93	同一	胸部異常影、症状無し
19	60	女	2010.04	3	93	同一	発熱、呼吸困難、肺炎
20	74	男	2010.07	3	93	同一	発熱、肺炎
21	77	男	2011.07	3	93	同一	胸部異常影、症状無し
22	59	女	2011.09	3	93	同一	胸部異常影、症状無し
24	58	女	2012.08	3	93	未実施	胸部異常影、非定型肺炎疑い
25	74	男	2012.09	10	割り振られず*	実施ズミ	発熱、咳嗽、呼吸困難、肺炎、その後死亡(糖尿病あり)

\*: neuA増幅せず

表 4 浴槽水等由来 *L.pneumophila* SG3 株の分子疫学解析結果(平成 24 年度)

No	採取年月日	検体名	地域-施設No	菌数cfu/100ml	PFGE型
12-2	H24.6.4	浴槽水	MA-1	20	12i
12-3	H24.6.4	浴槽水	MA-5	40	11e
12-4	H24.5.30	浴槽水	OC	20	12g
12-5	H24.7.4	浴槽水	OC	15	11b
12-6	H24.7.4	浴槽水	OC	<10?	12e
12-7	H24.7.4	浴槽水	OC	10	12e
12-8	H24.7.4	浴槽水	OC	5300	12d
12-9	H24.7.4	浴槽水	OC	5500	12d
12-10	H24.7.4	浴槽水	OC	3000	12b
12-11	H24.7.24	浴槽水	BI-2	200	12a
12-12	H24.7.18	浴槽水	OC		12b
12-14	H24.9.24	浴槽水	MA-1	10	11e
12-15	H24.9.25	浴槽水	MI-3	240	12u
12-16	H24.9.25	浴槽水	MI-2	30	12b
12-17	H24.11.21	浴槽水	KC-3	6250	12i
12-13	H24.8.27	浴槽水	MA-2	230	12c
LZ 12-1	H24.8.20	浴槽水	OC	10	12e
LZ 12-10	H24.9.25	フローミル	OC-2	170	12s
LZ 12-11	H24.9.25	フローミル	OC-2	170	12s
LZ 12-12	H24.9.25	フローミル	OC-2	170	12s
LZ 12-13	H24.10.5	フローミル	OC	10	12s
LZ 12-14	H24.10.10	浴槽水	OC	430	12t
LZ 12-15	H24.10.10	プール水	OC	10	12r
LZ 12-16	H24.10.10	プール水	OC	10	12r
LZ 12-17	H24.10.16	原湯	MA	60	11e
LZ 12-18	H24.10.16	原湯	MA	60	12i
LZ 12-19	H24.10.16	原湯	MA	60	12m
LZ 12-2	H24.8.20	浴槽水	OC	10	11b
LZ 12-20	H24.11.5	ろ過水	OC-3	170	12r
LZ 12-21	H24.11.5	ろ過水	OC-3	170	12r
LZ 12-22	H24.11.5	ろ過水	OC-3	170	12r
LZ 12-23	H24.11.5	ろ過水	OC-3	170	12r
LZ 12-24	H24.11.8	プール水	OC-1	30	12r
LZ 12-25	H24.11.8	プール水	OC-1	30	12r
LZ 12-26	H24.11.8	プール水	OC-1	30	12r
LZ 12-3	H24.8.20	浴槽水	OC	10	11b
LZ 12-4	H24.8.24	プールろ過水	OC-1	10	12r
LZ 12-5	H24.9.25	フローミル	OC-2	170	12s
LZ 12-6	H24.9.25	フローミル	OC-2	170	12s
LZ 12-7	H24.9.25	フローミル	OC-2	170	12s
LZ 12-8	H24.9.25	フローミル	OC-2	170	12s
LZ 12-9	H24.9.25	フローミル	OC-2	170	12s
研 12-20	H24.6.11	浴槽水	BH-2	60	12b
研 12-59	H24.7.23	浴槽水	BI-3	640	12a



M: Salmonella Braenderup, ★:患者株(K110707),

① 11a: 11-5, 11b:11-6, 11c: 11-11, 11d: 11-7, 11e: 11-4, 11f: 9-10, 11g: 11-2, 11h: 11-3,  
12a: 研 12-59, 12b: 研 12-20, 12c: 12-13, 12d: 12-9, 12e: 12-7, 11b: 12-5

② 12g: 12-4, 11e: 12-3, 12i: 12-2, 12j: 11-18, 11h: 11-3, 12L: 11-15, 12m: 10-5, 12n: 10-7,  
12p: 10-9, 12q: 9-1, 12r: LZ 12-4, 12s: LZ 12-5, 12t: LZ 12-14, 12u: 12-15

図 1 患者および浴槽水等由来 *L.pneumophila* SG3 株の PFGE パターン



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

DNA-DNA ハイブリダイゼーション法による *Legionella pneumophila* 亜種の同定

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
研究協力者	小谷野路子	埼玉県立大学	健康開発学科
研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨：レジオネラ症の主要な起因菌である *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が、マイクロプレートでの比色による DNA-DNA ハイブリダイゼーション（DDH）法を用いたこれらの鑑別法を確立した。今年度は多数の株について亜種の鑑別を行った。3亜種の基準株および ATCC 株、計 18 株（血清群毎に各 1 株、血清群 5 のみ 4 株）を用いてこの鑑別法の正確さを確認できた。次に国内分離株 128 株について同様に DDH 法を実施したところ、1～15 の全血清群に *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* が分布し、血清群 1、3、4、11 で subsp. *fraseri* の存在が確認され、複数の血清群に分布することが分かった。subsp. *pascullei* は見出されなかった。遺伝子型別法である sequence-based typing (SBT) 法と亜種との相関を見ると、SBT 法で用いられる遺伝子のうち、特定の *pilE* の遺伝子配列をもつものが DDH 法により、*L. pneumophila* subsp. *fraseri* と同定される可能性が出てきた。

A. 研究目的

*L. pneumophila* は、*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascullei* の3亜種に分類される<sup>1)</sup>が、これらを鑑別するには DNA ホモロジーでしか規定できず、一般の検査室で鑑別は困難である。種鑑別用に市販されている DNA-DNA ハイブリダ

イゼーション（DDH）レジオネラ‘極東’キット（極東製薬工業）は、25 菌種の基準株の 1 本鎖 DNA がマイクロプレートのウェルにそれぞれ固定されており、被検菌から抽出した DNA と 50℃でハイブリダイゼーションを行い、比色定量法により、基準株と 70%以上の相同性が認められた場合に、その菌種と鑑別すること

ができる<sup>2)</sup>。そこで、3 亜種の 1 本鎖 DNA をマイクロプレートのウェルにそれぞれ固定し、55°C でハイブリダイゼーションを行うことで、市販のキットと同様の比色定量法により亜種を鑑別する方法を確立した<sup>3)</sup>。今年度はこの方法を用いて *L. pneumophilla* の血清群 1~15 の基準株・ATCC 株と国内の臨床および環境分離株を対象として *L. pneumophila* の亜種の同定を行い、*L. pneumophila* の血清群および遺伝子型別法として広く用いられている sequence-based typing (SBT) 法<sup>4)</sup>との関連を検討した。

## B. 研究方法

### 1 使用菌株

*L. pneumophila* 3 亜種の基準株および ATCC 株、計 18 株（血清群毎に各 1 株、血清群 5 のみ 4 株）と日本国内の臨床および環境由来株 128 株を用いた。

### 2 DDH 法

基準株である *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* Philadelphia-1、*L. pneumophila* subsp. *pasucullei* U8W、および ATCC 株の *L. pneumophila* subsp. *fraseri* Dallas 1E、対照として *E. coli* DH1 K12 株から抽出した DNA を熱変性により 1 本鎖にし、0.5 µg をマイクロプレートのウェルに固定した。DNA 抽出、固定の方法は昨年度の方法<sup>3)</sup>に従った。

DDH 法の操作・判定は市販 DDH レジオネラ‘極東’キットの手順<sup>2)</sup>に従い、市販キット内の試薬を使用した。被検菌株か

らガラスビーズ法により抽出した DNA をビオチンで標識し、1 本鎖 DNA とし、マイクロプレートのウェルに固定した *L. pneumophila* 各亜種の 1 本鎖 DNA と 55~58°C で、90 分間ハイブリダイゼーションを行った。各ウェル内で形成されたハイブリッド DNA の比率をビオチン-アビジン反応を用いて測定することで比較し、被検菌 DNA と最も強く反応したウェルの菌種を被検菌の亜種と同定した。

## C. 研究結果

DDH 法の結果、血清群 1~15 の基準株・ATCC 株 18 株（表 1）は Brenner らの報告<sup>1)</sup>通りに鑑別された。すなわち、血清群 4、15 は *L. pneumophila* subsp. *fraseri* と同定され、血清群 5 は 1 株が *L. pneumophila* subsp. *fraseri*、3 株が subsp. *pasucullei* と同定された。それ以外の血清群の菌株は *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* と同定された。

次に国内分離株 109 株について同様に DDH 法を実施したところ、血清群 3、4、11 で subsp. *fraseri* の存在が確認された（表 2）。基準株・参照株と国内分離株の結果から血清群と亜種に相関は見られなかった。由来別に国内分離株の subsp. *fraseri* の分布を見たところ、臨床分離株 46 株では subsp. *fraseri* は 1 株（2%）だけだった。環境分離株 63 株では、subsp. *fraseri* は 4 株（6%）と占める割合が高かった。さらに環境分離株の内訳をみると、風呂水（34 株中 1 株）より冷却塔水（20 株中 2 株）

表 1 *L. pneumophila* の基準株・ATCC 株

マイクロプレートのウェルに DNA を固定した菌株に○を付した。

基準株

亜種名	血清群	株名	由来*	ATCC 番号
○ <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	1	Philadelphia-1	C	33152
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	4	Los Angeles-1	C	33156
○ <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i>	5	U8W	E	33737

ATCC 株

亜種名	血清群	株名	由来	ATCC 番号
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	2	Togus-1	C	33154
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	3	Bloomington-2	E	33155
○ <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	5	Dallas 1E	E	33216
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	6	Chicago 2	C	33215
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	7	Chicago 8	E	33823
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	8	Concord 3	C	35096
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	9	IN-23-G1-C2	E	35289
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	10	Leiden 1	C	43283
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	11	797-PA-H	C	43130
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	12	570-CO-H	C	43290
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	13	82A3105	C	43736
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	14	1169-MN-H	C	43703
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	15	Lansing 3	C	35251
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i>	5	MICU B	E	33735
<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i>	5	U7W	E	33736

\*C: 臨床分離株、E: 環境分離株

からの分離が多いことが分かった。土壌分離株は 6 株中 1 株が、subsp. *fraseri* だった。他にシャワー水分離株 2 株、雨水からの分離株 1 株はいずれも、subsp. *pneumophila* だった。

亜種を鑑別した菌株について SBT による遺伝子型を確認したところ、SBT で用いられる 7 つの遺伝子のうち、*pilE* の塩基配列のタイプと亜種の種類に相関が見られた。すなわち、*pilE14* と *pilE27* が

表2 *L. pneumophila* 国内分離株 109 株の DDH 法による亜種同定結果

血清群	亜種			菌株数
	<i>pneumophila</i>	<i>fraseri</i>	<i>pascullei</i>	
1	10	0	0	10
2	7	0	0	7
3	9	1	0	9
4	5	2	0	7
5	16	0	0	16
6	8	0	0	8
7	7	0	0	7
8	8	0	0	8
9	7	0	0	7
10	6	0	0	6
11	2	2	0	4
12	7	0	0	7
13	6	0	0	6
14	2	0	0	2
15	4	0	0	4
計	104	5	0	109

subsp. *fraseri* で、それ以外が subsp. *pneumophila* だった (表3)。そこで、すでに遺伝子型の判明している菌株から新たに *pilE14* と *pilE27* の菌株 19 株 (全て血清群 1) を選んで、DDH 法を行ったところ全てが subsp. *fraseri* と同定された (表4)。

#### D. 考察

昨年度の結果から、亜種の同定にはハイブリダイゼーション時の温度は 55°C が

最適だったので、今回も同様の条件で同定を行ったが、被検菌によっては、55°C では判定基準を満たさず同定不能なケースもあった。そこで反応温度を 58°C に上げたところ、それらの菌株も同定することができた。亜種レベルの同定は微妙な温度の違いが結果に影響を及ぼすことが分かった。

亜種の違いは全 DNA 相同性に基づくもので、DDH 法を用いて同定するのが理

表3 国内分離株(109株)における *pilE* 遺伝子のタイプ

	<i>pilE</i> type															計
	1	3	4	5	6	8	10	12	13	14	17	20	21	22	27	
subsp. <i>pneumophila</i>	4	6	11	6	10	2	31	16	11	0	1	1	3	2	0	104
subsp. <i>fraseri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	5

表4 *pilE* 遺伝子のタイプと亜種の相関

菌株番号	<i>pilE</i> type	同定結果
NIIB0565	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB0583	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB0590	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB0591	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB0595	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB0694	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB0718	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB0741	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB0746	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB0778	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB1075	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB1077	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB1098	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB1207	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB1269	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB0847	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB0975	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB1147	14	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>
NIIB2752	27	<i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>

想的であるが、*pilE* 遺伝子が亜種のマーカーとして活用できる可能性が示唆された。しかし、*pilE* 遺伝子には現時点で 45 の遺伝子座が報告されており、被検菌株数をさらに増やし、多くの遺伝子座についての検討が必要である。また、他の遺伝子についても亜種との相関がどの程度見られるか、また、絨毛をコードしている *pilE* が亜種との相関を示す理由も明らかにしなければならない。

#### E. 結論

DDH 法は特別な機器や手技を必要とせず行なうことができる有用な種鑑別の方法であるが、亜種の鑑別も可能であることが実証できた。

国内分離株の亜種の分布を調べたところ、*L. pneumophila subsp. pneumophila* が多く、全 15 血清群に分布し、*L. pneumophila subsp. fraseri* は少数で、血清群 1、3、4、11 で見つかった。*L. pneumophila subsp. pascullei* は検出できなかった。基準株・参照株も含めると、*L. pneumophila subsp. fraseri* は、血清群 1、3、4、5、11、15 に分布し、*L. pneumophila subsp. pascullei* は参照株の血清群 5 の 3 株のみであった。*L. pneumophila subsp. fraseri* は *L. pneumophila subsp. pneumophila* に比べると、臨床由来株が少なく、冷却塔水から多く分離されていた。

遺伝子型別における *pilE* 遺伝子のタイ

プは亜種を示す一種のマーカーとしての活用の可能性があることが分かった。

#### F. 参考文献

- 1) 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. pascullei subsp. nov.*, J. Clin. Microbiol., 1988, 26: 1695-1703.
- 2) DDH レジオネラ‘極東’（極東製薬工業株式会社）使用書
- 3) 山崎利雄、前川純子、倉文明、杉山寛治、縣邦雄、磯部順子、緒方喜久代：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 p171-177.
- 4) [http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_home\\_page.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_home_page.php)

#### G. 研究発表

なし。

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24年度分担研究報告書

抗酸菌の調査と *Mycobacterim avium* の遺伝子型

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 株式会社 マルマ  
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菌種が増えるかどうかの再調査をおこなった。総検体数 482 検体から抗酸菌陽性は 60 検体、検出された抗酸菌は 75 株であった。結核菌は、検出されなかった。非結核性抗酸菌症の原因菌のうち臨床的に重要な *Mycobacterium avium* は、27 株が検出された。この環境由来株と研究室保存の *M. avium* の合計 89 株用いて縦列反復数可変 (Variable Numbers of Tandem Repeats ; VNTR) 領域型別解析法を行い、minimum spanning tree (MST) 法による解析では、3 つのグループに大別された。鳥由来と象由来株は、1 グループを形成したが、ヒト由来株と環境由来株では、明確な違いは見られなかった。

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。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年度のわれわれの調査でも、レジオネラ属菌とともに、非結核性抗酸菌が検出された<sup>1)</sup>。しかし、非結核性抗酸菌は、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。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<sup>1)</sup>。家庭用の24時間風呂から *M. avium* が検出されたという報告<sup>2)</sup> 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<sup>3) 4)</sup> 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共に *M. avium* の対策に役立てることを最終目的とした。前年度は、抗酸菌の調査をした総検体数232検体から抗酸菌陽性は50検体、抗酸菌は65株検出され、抗酸菌の同定を行ったと報告した<sup>5)</sup>。今年度は、前年度に引き続き未検査検体の抗酸菌検出と分離菌の同定試験を行った。また、*M. avium* の環境由来株と研究室保存の *M. avium* を用いて縦列反復数可変 (VNTR) 領域型別解析法を行い、minimum spanning tree法による解析を行った。

## 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分間遠心分離後の沈渣を、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の10倍希釈系列を作り、それぞれの0.1mlずつをMiddlebrook 7H10寒天培地に接種し、5%CO<sub>2</sub> 孵卵器内で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、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)<sup>6)</sup>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)<sup>7)</sup>を用いた。DDH試験法の操作、判定は、使用説明書に従

った。また、16S-rRNAのDNAの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' TGCACACAGGCCACAAGGGA 3')を用いてPCRを行い、PCRプロダクトをHigh pure PCR product Purification kit(ベ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. VNTR法

PCRは、西森らの方法<sup>3)</sup>にしたがったが、表1に示した15種類のプライマーセット(MATR)を用いた。PCRは、95°C5分のプレヒーティング後、98°C10秒、68°C30秒、72°C1分の増幅サイクルを36回実行した。PCR産物をGCK-5000 Gel Cartridge Kit(e-gene社)を用いた、キャピラリー全自動電気泳動装置(e-gene社)を用いてアライメントマーカー(15bp,1000bp)と共に電気泳動した。サイズマーカー{Marker4(φX174/HaeIII digest 日本ジーン社)}を用いて泳動距離と濃度を測定



し、自動補正を行い、各バンドの DNA サイズと濃度を測定した。増幅産物のバンドのサイズから、西森等の換算表（表 2）にしたがって反復配列のコピー数（TR 数と略す）を求め、アリルプロファイルを作成し、Bio Numerics ver. 5.1 ソフトを用いて minimum spanning tree (MST) 法により解析した。

## C. 研究結果

### 1. 抗酸菌の検出

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 482 検体から抗酸菌陽性は 60 検体、抗酸菌は 75 株検出された（表 3）。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* 6 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、*M. paraffinicum* 1 株であった。III 群菌（非発色菌）は、*M. avium* 27 株、*M. celatum* 1 株、*M. intracellulare* 3 株、*M. terrae* 6 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。結核菌は、検出されなかった（表 4）。

### 2. *M. avium* の VNTR 法による解析

今回検出された *M. avium* 27 株および当研究所にて -80°C にて凍結保存した *M. avium* 69 株の合計 89 株について VNTR 法を実施した。供試菌の内訳は、浴槽水 36 株、ヒト 29 株、鳥類 11 株、濾過材 9 株、冷却塔水 3 株、象 1 株である。各株のアリルプロファイルを表 5 の様に作り、Bio Numerics ver. 5.1 ソフトを用いて Minimum spanning tree 法により解析した結果を図 1 に示した。*M. avium* 間の VNTR の MST 法による解析では、3 つのグループに大別された。浴槽水 36 株、冷却塔水 3 株、濾材 9 株の計 48 株間では、2 つのグループに大別された。象 1 株と鳥由来 11 株のグループにヒト由来株は 1 例もなかった。

ヒト由来 29 株と環境水由来菌 48 株間に明確な違いは見られなかった。

## D. 考察

わが国の非核性抗酸菌症の最も新しい罹患率のデータは 2007 年の人口 10 万あたり 5.7 人とされている<sup>8)</sup>。このうち *M. avium-intracellulare* complex (MAC) 感染症は、80% といわれているので人口 10 万人あたり 4.6 人となる。一方、我が国の新規登録の全結核患者数は、平成 23 年には 22,681 人で、罹患率（人口 10 万対）は 17.7 であるので、結核に比べ非核性抗酸菌症の罹患率は低いが、計算上約 2000 人が存在することになる。MAC 症の増加は、シャワー使用頻度の増加などが原因であるとも言われており、実際にシャワー周囲の菌量の検討などが報告されているが<sup>9)</sup>、一般環境中で棲息する非結核性抗酸菌の分布についても、今後の調査研究の大きな課題である。また、MAC 症による死亡数は、関東で多いが、粗死亡率では西高東低の傾向があり、粗死亡率でみると、北海道、東北に次いで関東は低い値となり、最も高いのが四国地方であった<sup>10)</sup>。また、坂谷らはアンケート調査から非結核性抗酸菌症例数は西南日本に多く、東北日本に少ないと地域性があると指摘している<sup>11)</sup>。われわれの前回<sup>1)</sup>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、ほとんどないと言える。しかし、浴槽水等 482 検体から非結核性抗酸菌が 75 株検出された。協力いただいた地方衛生研究所が限られた為、地域性についてははっきりしないが、関東より西側の方が多く分離されたという印象である。

今回検出された非結核性抗酸菌のうち、*M. kansassi* 6 株、*M. gordonae* 15 株、*M. scrofulaceum* 1 株、*M. avium* 27 株、*M. intracellulare* 3 株、*M. terrae* 6 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る。

今回試験した*M. avium* 89株のVNTRのMST法による解析では、3つのグループに大別された。象1株と鳥由来11株のグループは、ヒトや環境水由来株とは明確に別のグループを形成した。このことは、宿主依存性によって変化した可能性を否定できないが、鳥から直接ヒトに感染する可能性は、低い事を示唆していると思われる。

*M. avium*は、ヒトからヒトへは感染しないと言われている。浴槽水36株、冷却塔水3株、濾材9株の計48株間では、2つのグループに大別された。また、ヒト由来29株と環境水由来菌48株間に明確な違いは見られなかった。このことは、浴槽の吸水口や洗い場において*M. avium*を含むエアロゾルを吸い込んだ場合、*M. avium*に感染する可能性がある事を示唆しているので、レジオネラ属菌対策と同様、こまめな消毒・清掃が重要であろう。

#### 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 482 検体から抗酸菌陽性は 60 検体、抗酸菌は 75 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。また、今回検出された *M. avium* 27 株および当研究所にて -80°C にて凍結保存した *M. avium* 69 株の合計 89 株について VNTR 法を実施した。minimum spanning tree 法による解析では、*M. avium* が 3 つのグループに大別された。象 1 株と鳥由来 11 株のグループは、ヒトや環境水由来株とは明確に別のグループを形成したが、ヒト由来 29 株と環境水由来菌 48 株間に明確な違いは見られなかった。これらの菌種を含む浴用水は、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。

#### 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) 齊藤肇、村上 和保、石井則久、榎 赫儺、「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、Molecular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 22 年度分担研究報告書 p 207-213

6) 極東抗酸菌鑑別セット(極東製薬工業)使用書

7) DDH マイコバクテリア 極東'(極東製薬工業株式会社)使用書

8) 佐藤滋樹：非結核性抗酸菌症とくにMAC 症の全国疫学調査。第39 回非結核性抗酸菌症研究協議会報告。2007, 大阪。

9) Falkinham JO 3rd, Iseman MD, de Haas P, et al. : *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. J Water Health. 2008 ; 6 : 209-213.

10) 森本耕三、岩井和郎、大森正子、奥村 昌夫、吉山崇、吉森浩三、尾形英雄、倉島篤行、工藤翔二、日本の非結核性抗酸菌症死亡に関する

統計的分析、結核86：547-552、2011

1) 坂谷光則:非定型抗酸菌症の疫学と臨床. 結核. 1993；68：43-46.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 山崎利雄、前川純子、磯部順子、縣 邦雄、杉山寛治、緒方喜久代、倉 文明、温泉等の浴槽水の抗酸菌検出調査と分離された*Mycobacterium avium* のVNTR法による解析、第82回実験結核研究会総会、2012年5月、広島

H. 知的所有権の取得状況

なし

表1 *Mycobacterium avium* のVNTR型別用プライマー

VNTR領域名	プライマー名	シーケンス	塩基数
MATR-1	TR165-1	5':GAACGTTGGGCCGAATGCGA	20
	TR165-2	5':GTGTCGGACCCCTCCCGTAA	20
MATR-2	TR176-1	5':TTGAGCAGCTCGTAAAGCGT	20
	TR176-2	5':CGCGCTCAAGGAGATGGTTC	20
MATR-3	TR232-1	5':CCAATCACAACGGCACCATC	20
	TR232-2	5':TCCTCGACAATCAGCACACT	20
MATR-4	TR65-1	5':GACAATGGCATGCCGATCCT	20
	TR65-2	5':CGCTACGGCCTTCTCCATCT	20
MATR-5	TR130-1	5':CTTGCAGCAGGACGATCAGG	20
	TR130-2	5':GTGGTCGAAGTCGCTGTTGG	20
MATR-6	TR131-1	5':TCGCAGGAAACCAACCTCAA	20
	TR131-2	5':GCGTGATCGACTCGAAGACC	20
MATR-7	TR30-1	5':CCGAGGAAGAGACGAAACCC	20
	TR30-2	5':TCGTCACCCACAACATGCAG	20
MATR-8	TR57-1	5':CAGGTCCAGGGCATGTTTCC	20
	TR57-2	5':TCCCGATAATCCGTTGCATGAC	22
MATR-9	TR100-3	5':CTGTTGGAGCGCAGCCGTTT	20
	TR100-4	5':ACCCAGTCGTCGACGGTGTT	20
MATR-11	TR43-1	5':TGGCTGCTGTTCAATTGGATG	21
	TR43-2	5':TCGTCCGGTCAATTGCACCTT	20
MATR-12	TR8-1	5':TGATGGCGACCACCGACAAGG	21
	TR8-2	5':TGGATGCGGCCGACCAACA	19
MATR-13	TR91-1	5':CCTCGAAGGTGGCGGACTTG	20
	TR91-2	5':ACCAGGATGGTGCCCAAACC	20
MATR-14	TR92-1	5':TGGTCGCCGCACACCTACT	19
	TR92-2	5':GCCCTTACTGGGCAGGTCCTTC	22
MATR-15	TR93-1-1	5':GGAAGGCAGCAAGGGTCAAC	20
	TR93-1-2	5':TCAGGTCCAGCGACAGCTTC	20
MATR-16	TR93-2-1	5':GTGGTCAGCACCCGGAGAGT	20
	TR93-2-2	5':ACCACCGACTGCTCGACCTT	20

(西森ら、動衛研研究報告 第109号:25-32、平成15年3月より)

表2 VNTR領域において含まれるTRの反復数を求める換算表

VNTR 領域名	TRのサイズ (bp)	PCR増幅産物から推測されるTRの反復数とサイズ (bp)								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
MATR-1	53	228	281	334	387	440	493	546	599	652
MATR-2	53	194	247	300	353	406	459	512	565	618
MATR-3	53	195	248	301	354	407	460	513	566	619
MATR-4	53	168	221	274	327	380	433	486	539	592
MATR-5	58	133	191	249	307	365	423	481	539	597
MATR-6	58	210	268	326	384	442	500	558	616	674
MATR-7	57	220	277	334	391	448	505	562	619	676
MATR-8	57	106	163	220	277	334	391	448	505	562
MATR-9	55	325	380	435	490	545	600	655	710	765
MATR-11	55	284	339	394	449	504	559	614	669	724
MATR-12	57	371	428	485	542	599	656	713	770	827
MATR-13	56	235	291	347	403	459	515	571	627	683
MATR-14	58	215	273	331	389	447	505	563	621	679
MATR-15	57	194	251	308	365	422	479	536	593	650
MATR-16	59	241	300	359	418	477	536	595	654	713

(西森ら、動衛研研究報告 第109号:25-32、平成15年3月より)

表3 検出抗酸菌の地研由来別数

	調査地方別数				合計
	関東	中部	北陸	九州	
調査施設数	100	32	96	31	259
浴槽・源泉等数	100	45	263	58	466
検体数	100	61	263	58	482
地研検出菌株数	(16)	26	8	(10)	60
純化後同定菌株数	22	31	9	13	75

( ): レジオネラ検出用100倍濃縮液を感染研に移送、感染研にて検出した数

表4 浴槽水等から検出された抗酸菌の同定結果

ラニオン 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. kansasii</i>	6	5		1	
	<i>M. simiae</i>	2	1		1	
II群菌	<i>M. gordonae</i>	15	4	1	9	1
	<i>M. intermedium</i>	1			1	
	<i>M. scrofulaceum</i>	1	1			
	<i>M. paraffinicum</i>	1				1
III群菌	<i>M. avium</i>	27	13	7	3	4
	<i>M. celatum</i>	1				1
	<i>M. intracellulare</i>	3	1		2	
	<i>M. terrae</i>	6	2		3	1
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
合計		75	31	9	22	13