

を含む)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定 なし)

表1 平板培養菌の生菌数測定 (550nm,OD値0.35)

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

(GVPC α 培地使用)

表2 平板培養菌を用いたハイドロキシアパタイト(AP12C)添加の効果

| No. | メンブランフィルター (ADVANTEC) |       | ハイドロキシアパタイト | 添加菌数 CFU/100ml ( % ) | 回収率 ( % ) |
|-----|-----------------------|-------|-------------|----------------------|-----------|
|     | 材質                    | 孔径 μm | 添加量 g       |                      |           |
| 1   | ポリカーボネート              | 0.20  | 0           | 240                  | ( 126.3 ) |
| 2   | セルロースアセテート            | 0.20  | 0           | 280                  | ( 147.4 ) |
| 3   | セルロースアセテート            | 0.45  | 0           | 230                  | ( 121.1 ) |
| 4   | セルロースアセテート            | 0.45  | 0.2         | 68                   | ( 35.8 )  |
| 5   | セルロースアセテート            | 0.45  | 0.4         | 130                  | ( 68.4 )  |
| 6   | セルロースアセテート            | 0.45  | 0.8         | 65                   | ( 34.2 )  |
| 7   | セルロースアセテート            | 0.45  | 1.6         | 8                    | ( 4.1 )   |

(添加菌数190CFU/100ml、検水量:500ml×2、GVPC α 培地使用)

表3 平板培養菌を用いた珪藻土およびハイドロキシアパタイト(API2C)の効果

| No. | メンブランフィルター (ADVANTEC) |       | ろ材          |       | 回収菌数 CFU/100ml ( % ) | 回数率 ( % ) |
|-----|-----------------------|-------|-------------|-------|----------------------|-----------|
|     | 材質                    | 孔径 μm | 種類          | 添加量 g |                      |           |
| 1   | ポリカーボネート              | 0.20  | 添加なし        | 0     | 350                  | ( 38.9 )  |
| 2   | セルロースアセテート            | 0.20  | 添加なし        | 0     | 270                  | ( 30.0 )  |
| 3   | セルロースアセテート            | 0.45  | 添加なし        | 0     | 220                  | ( 24.4 )  |
| 4   | セルロースアセテート            | 0.45  | 珪藻土         | 0.4   | 140                  | ( 15.6 )  |
| 5   | セルロースアセテート            | 0.45  | ハイドロキシアパタイト | 0.4   | 27                   | ( 3.0 )   |
| 6   | セルロースアセテート            | 0.45  | ハイドロキシアパタイト | 0.8   | 55                   | ( 6.1 )   |
| 7   | セルロースアセテート            | 0.45  | ハイドロキシアパタイト | 1.6   | 36                   | ( 4.0 )   |

(添加菌数900CFU/100ml、検水量:500ml×2、GVPC α 培地使用)

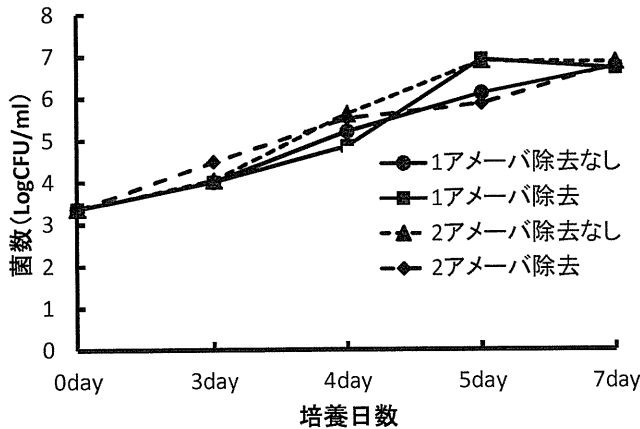


図1 アモebaを用いたレジオネラ増菌

(GVPCα培地使用、アモeba除去:5μmフィルター使用)

表4 アモeba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5 平板培養菌とアメーバ増菌培養菌を用いたろ過メンブランフィルターの検討結果

| No. | メンブランフィルター<br>(ADVANTEC)<br>材質 | 孔径<br>μm | 添加回収             |                 |                 |                 |
|-----|--------------------------------|----------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|     |                                |          | 平板培養菌            |                 | アメーバ増菌培養菌       |                 |
|     |                                |          | CFU/100ml ( % )  | CFU/100ml ( % ) | CFU/100ml ( % ) | CFU/100ml ( % ) |
|     |                                |          | 900              | ( 100 )         | 14              | ( 100 )         |
| 1   | ポリカーボネート                       | 0.20     | 350              | ( 38.9 )        | 12              | ( 85.7 )        |
| 2   | ポリカーボネート                       | 0.40     | ND <sup>1)</sup> | ( - )           | 5               | ( 35.7 )        |
| 3   | セルロース混合エステル                    | 0.20     | ND               | ( - )           | 1.7             | ( 12.1 )        |
| 4   | セルロースアセテート                     | 0.20     | 270              | ( 30.0 )        | 12              | ( 85.7 )        |
| 5   | セルロースアセテート                     | 0.45     | 220              | ( 24.4 )        | 1.7             | ( 12.1 )        |

(検水量:500ml×2、GVPC α 培地使用)

1) ND:Not done

表6 アメーバ増菌培養菌を用いたろ過メンブランフィルターの検討結果

| No. | メンブランフィルター <sup>1)</sup><br>材質 | 孔径 μ<br>m | 添加回収             |          |                 |           |
|-----|--------------------------------|-----------|------------------|----------|-----------------|-----------|
|     |                                |           | CFU/100ml ( % )  |          | CFU/100ml ( % ) |           |
|     |                                |           | 14               | ( 100 )  | 260             | ( 100 )   |
| 1   | ポリカーボネート                       | 0.20      | 12               | ( 85.7 ) | 370             | ( 142.3 ) |
| 2   | ポリカーボネート                       | 0.40      | 5                | ( 35.7 ) | 180             | ( 69.2 )  |
| 3   | セルロース混合エステル                    | 0.20      | 1.7              | ( 12.1 ) | 140             | ( 53.8 )  |
| 4   | セルロース混合エステル                    | 0.45      | ND <sup>2)</sup> | ( - )    | 180             | ( 69.2 )  |
| 5   | セルロースアセテート                     | 0.20      | 12               | ( 85.7 ) | 210             | ( 80.8 )  |
| 6   | セルロースアセテート                     | 0.45      | 1.7              | ( 12.1 ) | 170             | ( 65.4 )  |

(検水量:500ml×2、GVPC α 培地使用)

1) No.1-3,5,6: ADVANTEC、No.4:MILIPORE

2) ND:Not done

表7 アメーバ増菌培養菌を用いたろ過メンブランフィルターの検討結果

| No. | メンブランフィルター <sup>1)</sup><br>孔径 ( μm) | 添加回収            |         |                 |         |                 |                  |                 |         |                 |         |          |
|-----|--------------------------------------|-----------------|---------|-----------------|---------|-----------------|------------------|-----------------|---------|-----------------|---------|----------|
|     |                                      | CFU/100ml ( % ) |         | 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 <sup>2)</sup> | ( - )           | 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   | セルロース混合エステル                          | 0.20            | 140     | ( 53.8 )        | 130     | ( 38.2 )        | ND               | ( - )           | ND      | ( - )           | ND      | ( - )    |
| 6   | セルロース混合エステル                          | 0.45            | 180     | ( 69.2 )        | 110     | ( 32.4 )        | ND               | ( - )           | ND      | ( - )           | ND      | ( - )    |

(検水量:500ml×2、GVPC α 培地使用)

1) No.1-5: ADVANTEC、No.6:MILIPORE

2) ND:Not done

表8 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 <sup>1)</sup> | 孔径<br>( $\mu\text{m}$ ) | n | 回収率(%) |       | 0.2 $\mu\text{m}$ ポリカーボネートと比較<br>P値 <sup>2)</sup> |
|-----|--------------------------|-------------------------|---|--------|-------|---|
|     |                          |                         |   | 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

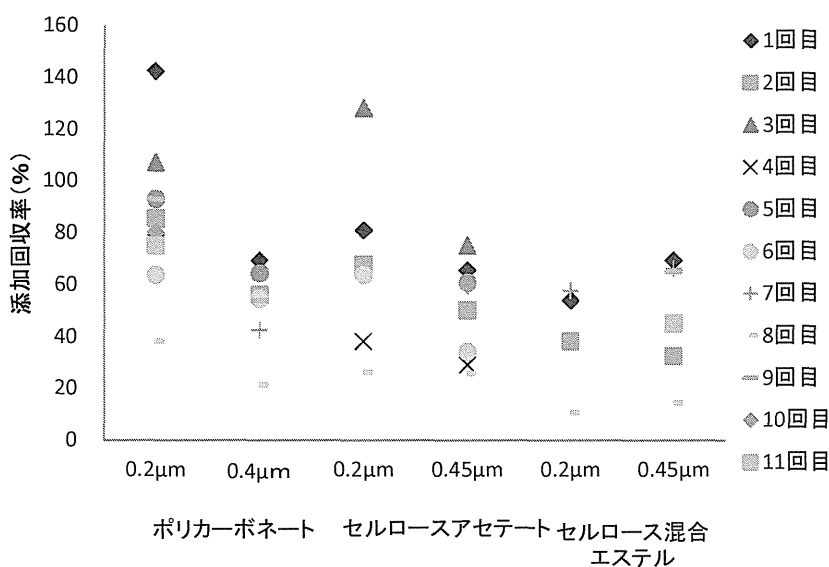


図2 ろ過フィルターの材質・孔径による回収率

(GVPC $\alpha$ 培地使用、アメーバ除去 5 $\mu\text{m}$ フィルター使用)

表9 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 $\mu\text{m}$ メンブランフィルターにおける通過検討結果

| No. | フィルター <sup>1)</sup> |                         | Aフォルダー使用                |                      | Bフォルダー使用 |               | Cフォルダー使用 |               |       |
|-----|---------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|----------|---------------|----------|---------------|-------|
|     | 材質                  | 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<br>( $\mu\text{m}$ ) | 孔径<br>( $\mu\text{m}$ ) | CFU/100ml ( )        | ( % )    | CFU/100ml ( ) | ( % )    | CFU/100ml ( ) | ( % ) |
| 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 <sup>2)</sup> ( ) | ( - )    | 0 ( )         | ( - )    | ND ( )        | ( - ) |

(検水量: 500ml $\times$ 2、GVPC $\alpha$ 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10 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 <sup>1)</sup> |            | 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<br>(μm)          | 孔径<br>(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 <sup>2)</sup> ( - ) |       | 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、径47mm 2段目ポリカーボネート使用

2) ND: Not Done

表11 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<br>(ADVANTEC) | 孔径<br>(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 ( )    | ( % )   |
|     |                          |            | $3.7 \times 10^7$      | ( 100 ) | $4.0 \times 10^7$ | ( 100 ) |
| 1   | ポリカーボネート                 | 0.4        | $\infty$ <sup>1)</sup> | ( - )   | $\infty$          | ( - )   |
| 2   | ポリカーボネート                 | 0.4        | $\infty$               | ( - )   | $\infty$          | ( - )   |
| 3   | ポリカーボネート                 | 0.4        | $\infty$               | ( - )   | $\infty$          | ( - )   |

(検水量: 菌液500 μl ( $3.7 \times 10^7$  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12 アメーバ増菌レジオネラの孔径0.45 μm一体型減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<br>(ADVANTEC) | 孔径<br>(μm) | 回収菌数             |               | 回収率               |            | 回収菌数                   |         | 回収率               |         |
|-----|------------------------|------------|------------------|---------------|-------------------|------------|------------------------|---------|-------------------|---------|
|     |                        |            | CFU/500 μl ( )   | ( % )         | CFU/500 μl ( )    | ( % )      | CFU/500 μl ( )         | ( % )   |                   |         |
|     |                        |            |                  |               | $2.2 \times 10^8$ | ( 100 )    | $3.7 \times 10^7$      | ( 100 ) | $4.0 \times 10^7$ | ( 100 ) |
| 1   | セルロースアセテート             | 0.45       | 244              | ( 0.00011 )   | 972               | ( 0.0026 ) | $\infty$ <sup>2)</sup> | ( - )   |                   |         |
| 2   | セルロースアセテート             | 0.45       | 268              | ( 0.00012 )   | 63                | ( 0.0002 ) | $\infty$               | ( - )   |                   |         |
| 3   | セルロースアセテート             | 0.45       | 1                | ( 0.0000005 ) | 976               | ( 0.0026 ) | $\infty$               | ( - )   |                   |         |
| 4   | セルロースアセテート             | 0.45       | ND <sup>1)</sup> | ( - )         | 804               | ( 0.0022 ) | $\infty$               | ( - )   |                   |         |
| 5   | セルロースアセテート             | 0.45       | ND               | ( - )         | 1028              | ( 0.0028 ) | $\infty$               | ( - )   |                   |         |
| 6   | セルロース混合エステル            | 0.45       | 0                | ( 0 )         | 0                 | ( 0 )      | 0                      | ( 0 )   |                   |         |
| 7   | セルロース混合エステル            | 0.45       | 0                | ( 0 )         | 0                 | ( 0 )      | 0                      | ( 0 )   |                   |         |
| 8   | セルロース混合エステル            | 0.45       | 0                | ( 0 )         | 0                 | ( 0 )      | 0                      | ( 0 )   |                   |         |
| 9   | セルロース混合エステル            | 0.45       | ND               | ( - )         | 0                 | ( 0 )      | 0                      | ( 0 )   |                   |         |
| 10  | セルロース混合エステル            | 0.45       | ND               | ( - )         | 0                 | ( 0 )      | 0                      | ( 0 )   |                   |         |

(検水量: 500 μl, 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13 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      | 回収菌数      | 回収率      |
|-----|-------|--------|-----------|-----------|----------|
|     |       |        | CFU/100ml | CFU/100ml | ( % )    |
| 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 μm、検水量: 500ml × 2, GVPC α 培地使用)

表14 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<br>μm | フィルター<br>径 | 回収菌数<br>CFU/100ml | 回収率<br>( % ) |
|-----|--------------------------|----------|------------|-------------------|--------------|
| 1   | セルロースアセテート <sup>1)</sup> | 0.45     | 47mm       | 61                | ( 7.3 )      |
| 2   | セルロースアセテート               | 0.45     | 25mm       | 220               | ( 26.2 )     |

(ビーズ:0.2g添加、添加菌数840CFU/100ml、検水量:500ml×2、GVPCα培地使用)

1) ADVANTEC

表15-1 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 <sup>1)</sup> |        | ろ材                   |        | ろ過時間<br>min | 回収菌数<br>CFU/100ml | 回収率<br>( % ) |
|-----|---------------------|--------|----------------------|--------|-------------|-------------------|--------------|
|     | 材質                  | 孔径(μm) | 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 <sup>2)</sup> | 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 <sup>3)</sup>  | ( 1.1 )      |

(添加菌数280CFU/100ml、検水量:500ml×2、GVPCα培地使用)

表15-2

| No. | フィルター <sup>1)</sup> |        | ろ材                   |        | ろ過時間<br>min | 回収菌数<br>CFU/100ml | 回収率<br>( % ) |
|-----|---------------------|--------|----------------------|--------|-------------|-------------------|--------------|
|     | 材質                  | 孔径(μm) | 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 <sup>2)</sup> | 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×2、GVPCα培地使用)

表15-3

| No. | フィルター <sup>1)</sup> |        | ろ材                   |        | ろ過時間<br>min | 回収菌数<br>CFU/100ml | 回収率<br>( % ) |
|-----|---------------------|--------|----------------------|--------|-------------|-------------------|--------------|
|     | 材質                  | 孔径(μm) | 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 <sup>2)</sup> | 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×2、GVPCα培地使用)

1) ADVANTEC、径47mm

2) 積水化成工業(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：*Legionella pneumophila* を収集して、SBT (sequence-based typing) 法を用いて遺伝子型別を行った。3年間で112株の*L. pneumophila* 臨床分離株、92株（感染源調査で分離され、臨床分離株と重複していると考えられる菌株を除くと、82株）の*L. pneumophila* 血清群1の環境分離株について型別を行った。臨床分離株と重複していると考えられる菌株を除いた浴槽関連株36株は21種類に型別され、多様であったが、冷却塔関連株28株は8種類に分けられ、19株がST (sequence type) 1となり、やや多様性に乏しかった。それ以外の環境分離株18株（噴水・修景水11株、シャワー水5株、加湿器、河川水（水道原水）各1株）については、12株がST1で残りの6株はそれぞれ異なるSTだった。環境分離株全体（82株）では、32種類のSTが見出された。一方、臨床分離株112株は64種類に分けられた。Minimum spanning tree解析を行い環境分離株と対応させると、環境分離株で見出されたグループの他に新しい1つのグループ（感染源が不明のものが多いためグループUと名付けた）が形成された。臨床分離株の遺伝的多様性はレジオネラ症の主要な感染源である浴槽水に由来する菌株の多様性を反映していると考えられるが、感染源不明の事例も多くあることから、浴槽水、冷却塔水以外の水検体数をさらに増やして、遺伝子型を調査する必要がある。

#### A. 研究目的

レジオネラ症の起原菌として最も多い*L. 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。3年間の検査の結果をまとめ、その傾向を明らかにする。

#### B. 研究方法

3年間の研究実施により収集した*L. pneumophila* 臨床分離株112株（分離年は2006年から2012年）およびレジオネラ症起原菌の8割を占める*L. pneumophila* 血清群1の環境分離株82株（それぞれ独立に分離された浴槽関連株36株、冷却塔水関

連株 28 株、噴水・修景水分離株 11 株、シャワー水 5 株、加湿器 1 株、河川水（水道原水）1 株）について 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<sup>1,2)</sup>。*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<sup>3)</sup>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。

血清群はデンカ生研のレジオネラ免疫血清 (1~15) により決定した。環境分離株については、血清群 1 の株について解析をおこない、臨床分離株は入手したものを血清群によらず、すべて解析した。臨床分離株は 2 名の患者が発生した 1 事例については同じ遺伝子型の株だったため 1 株のみの検査結果とし、逆に異なる

血清群あるいは遺伝子型を示す複数株が得られた患者 3 名の株 (それぞれ 3 株、4 株、2 株) はすべて検査結果とした。

### C. 研究結果

今回調べられた臨床分離株の血清群の内訳は、血清群 1 が 95 株、血清群 2 が 2 株、3 が 4 株、5 が 2 株、6 が 5 株、9、10、12 が各 1 株、型別不能が 1 株であった。

臨床分離株 112 株は *neuA* が増幅しなかった 2 株を除く 110 株が 64 種類の ST に分けられた。血清群 1 の環境分離株 (浴槽関連株 36 株、冷却塔水関連株 28 株、噴水・修景水分離株 11 株、シャワー水 5 株、加湿器 1 株、河川水 1 株) は 32 種類の ST に分けられた (表 1)。ST1 は環境分離株の 43% を占め、種々の水系から分離された。また、臨床からも 5 株分離されている。臨床分離株で最も多い ST23 (11 株)、ついで多い ST120 (8 株) は環境からは分離されなかった。次に多かった ST138 (6 株) は 5 株の事例について浴槽水が感染源だと推定され、実際に独立に浴槽水からも 3 株分離された。ST89、ST129、ST566、ST644 も浴槽水が感染源と推定あるいは確定されており、浴槽水から独立にその ST を示す株が分離された。

### D. 考察

以前の研究で、1980 年の日本で初めてのレジオネラ症患者からの臨床分離株を始め、わが国における *L. pneumophila* 臨床分離株 149 株について SBT を行ったとこ

表 1. 臨床分離株と環境分離株の ST の分布

1 株のみの ST は、その他にまとめた。

| 血清群 1 |       | 推定感染源              | 環境分離株 | 由来                                  | 計   |
|-------|-------|--------------------|-------|-------------------------------------|-----|
| ST    | 臨床分離株 |                    |       |                                     |     |
| 1     | 5     | 院内感染2、不明3          | 35    | 冷却塔水19、噴水・修景水9、浴槽水4、シャワー1、加湿器1、河川水1 | 40  |
| 23    | 11    | 浴槽水4、足湯1、シャワー1、不明5 | 0     |                                     | 11  |
| 138   | 6     | 浴槽水5(確定1)、不明1      | 3     | 浴槽水3                                | 9   |
| 120   | 8     | 温泉2、畑1、不明5         | 0     |                                     | 8   |
| 980   | 0     |                    | 6     | 浴槽水6                                | 6   |
| 48    | 0     |                    | 4     | 浴槽水3、冷却塔水1                          | 4   |
| 384   | 4     | 温泉2、土木作業1、不明1      | 0     |                                     | 4   |
| 42    | 4     | 院内感染2、不明2          | 0     |                                     | 4   |
| 1008  | 0     |                    | 3     | 冷却塔水2、シャワー1                         | 3   |
| 89    | 1     | 浴槽水                | 2     | 浴槽水2                                | 3   |
| 129   | 1     | 浴槽水                | 2     | 浴槽水2                                | 3   |
| 566   | 1     | 浴槽水                | 2     | 浴槽水2                                | 3   |
| 739   | 1     | 不明                 | 2     | 浴槽水1、冷却塔水1                          | 3   |
| 1077  | 3     | エアコン1、不明2          | 0     |                                     | 3   |
| 256   | 2     | 浴槽水1(確定)、不明1       | 1     | シャワー水                               | 3   |
| 59    | 2     | 浴槽水2(確定1)          | 1     | 浴槽水                                 | 3   |
| 609   | 2     | 温泉1、不明1            | 1     | 冷却塔水                                | 3   |
| 876   | 2     | 不明2                | 1     | 噴水                                  | 3   |
| 986   | 0     |                    | 2     | 冷却塔水                                | 2   |
| 687   | 1     | 不明                 | 1     | 浴槽水                                 | 2   |
| 353   | 2     | 不明2                | 0     |                                     | 2   |
| 644   | 2     | 浴槽水2(確定1)          | 0     |                                     | 2   |
| その他   | 36    |                    | 16    |                                     | 52  |
| 計     | 94    |                    | 82    |                                     | 176 |

| 血清群1以外 |       |             |
|--------|-------|-------------|
| ST     | 臨床分離株 | 血清群         |
| 93     | 4     | 3           |
| 68     | 2     | 6, 12       |
| 537    | 2     | 6           |
| 1136   | 2     | 9, UT       |
| その他    | 6     | 2, 5, 6, 15 |
| 計      | 16    |             |

血清群5と10の各1株は*neuA*が増幅せず、STが決まらなかった。

ろ、96 種類の ST に分けられ、型別の分解能を示す IOD (index of discrimination)<sup>4)</sup>を計算すると、0.989 となり、本法は型別法として有用であることを示した<sup>5)</sup>。本研究で新たに収集し、調べられた臨床分離株は 64 種類の ST に分けられ、IOD は 0.972 となった。IOD がやや下がったのは ST23 や ST120 など特定の ST を示す分離株が多かったためと考えられる。ST23 や ST120 は感染源不明の事例が多く、温泉への旅行歴などがなくてもレジオネラ症を疑い、診断される事例が増え

てきたため、諸外国の臨床分離株の SBT の IOD (英国で 0.901<sup>6)</sup>、アメリカで 0.946<sup>7)</sup>、カナダでは 0.964<sup>8)</sup>) に近づいてきたのかもしれない。環境において ST120 は人工水系から分離されたことはなく、道路の水溜りから初めて分離された<sup>9)</sup>。また、感染源不明の患者から分離された株の多くが水溜りから分離された菌株と遺伝的に近いと報告<sup>9)</sup>されており、人工水系以外の感染源調査も行う必要があると考えられる。

我々は以前、日本の *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株 (冷却塔水分離株



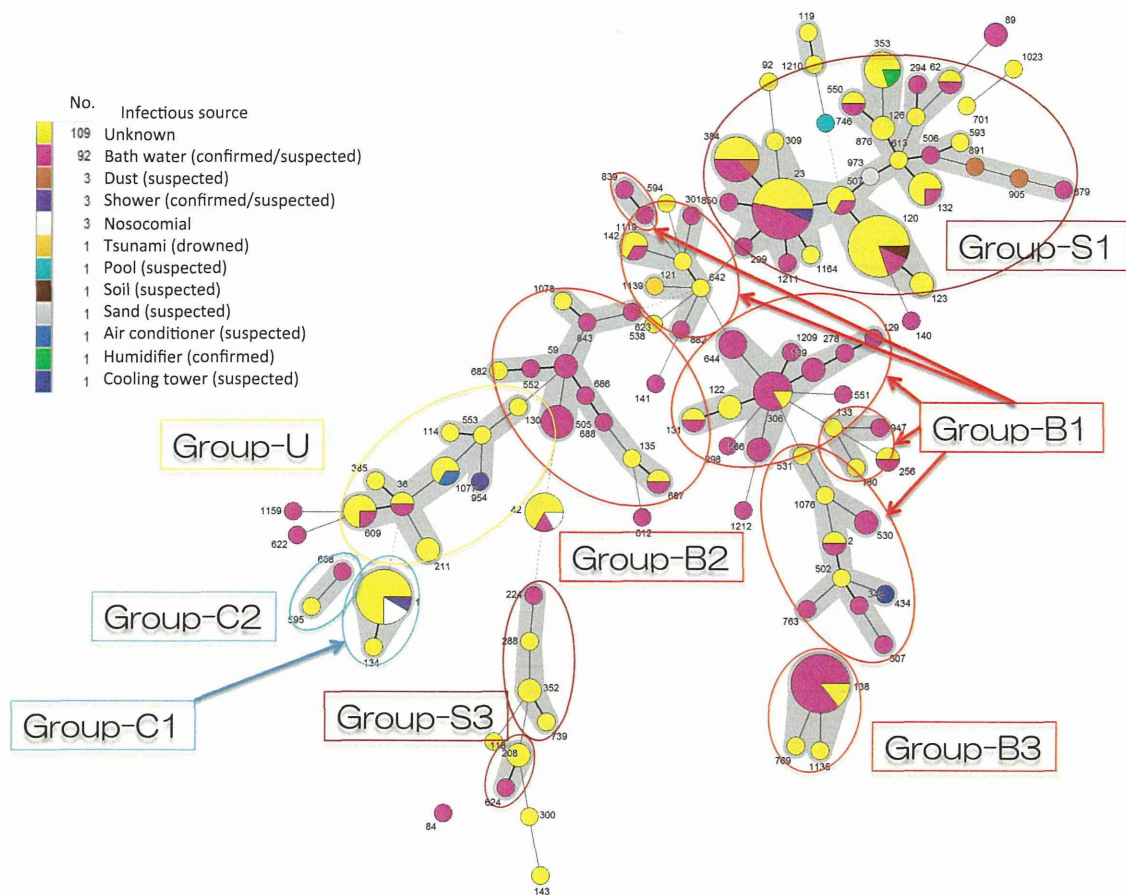


図1. Minimum spanning tree で示した 1980 年から 2012 年に分離された *L. pneumophila* 血清群 1 の臨床分離株 217 株の ST による類縁関係。円の脇の数字は ST ナンバーを示し、円の大きさはそれぞれの ST の株数に比例している。推定・確定された感染源により異なる色で株を示した（感染源不明は黄色、浴槽水はマゼンダなど）。ST をつなぐ枝は遺伝子座数の違いに比例して長くなっており、総枝長が最短になるように tree は描かれている。隣り合う ST の遺伝子座の違いが 2 つ以下の場合、周囲が灰色に塗られて、complex を形成していることを示している。それぞれの complex が、環境分離株の解析に基づき提唱（Amemura-Maekawa *et al.*, 2012. Appl. Environ. Microbiol. 12:4263-70）されたどのグループに属するかも示した。Group-B1, B2, B3 は浴槽水分離株が主に属するグループ、Group-C1, C2 は冷却塔水分離株が主に属するグループ、Group-S1, S2, S3 は土壌分離株が主に属するグループだが、国内の臨床分離株では Group-S2 に属する菌株はなかった。環境分離株の解析では見出されなかった Group-U が形成された。

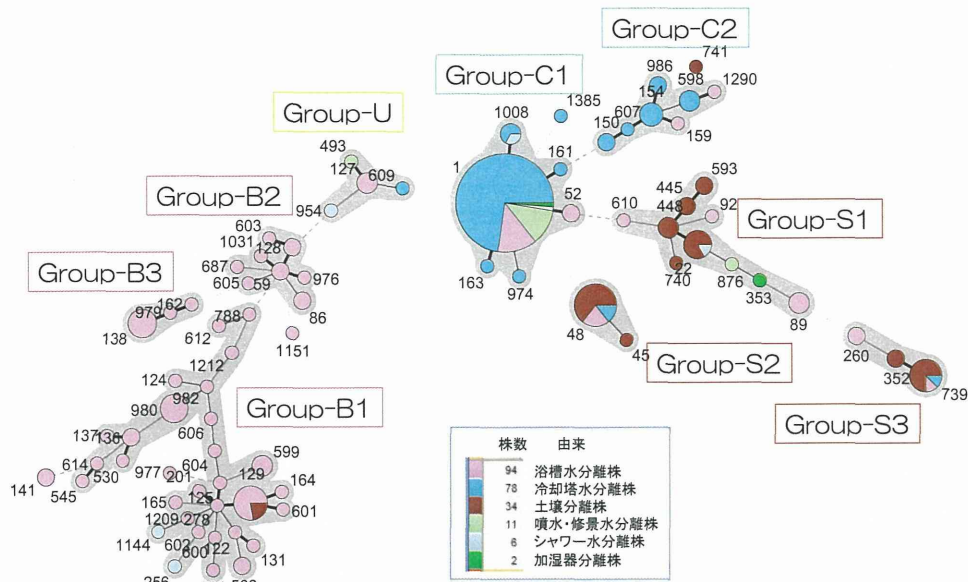


図 2. Minimum spanning tree で示した *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株 225 株の ST による類縁関係。以前解析した冷却塔水分離株 50 株、浴槽水分離株 50 株、土壌分離株 34 株の計 134 株 (Amemura-Maekawa *et al.*, 2012. *Appl. Environ. Microbiol.* 12:4263-70) に加えて、本研究で解析した 91 株 (冷却塔関連株 28 株、浴槽関連株 44 株、噴水・修景水 11 株、シャワー水 6 株、加湿器 2 株、感染源からの分離株 10 株を含む) について解析を行った。

50 株、浴槽水分離株 50 株、土壌分離株 34 株) について SBT を行い、Bionumerics (Applied Math 社) を用いて minimum spanning tree 解析を行ったところ、その遺伝子型の違いにより 8 つのグループに大別されることを見出した<sup>10)</sup>。それぞれのグループに属する大半の株はいずれか 1 種類の由来だった。すなわち、浴槽水分離株の大部分は B1、B2、B3 の 3 つのグループに、土壌分離株のほとんどは S1、

S2、S3 のいずれかのグループに、冷却塔水分離株は 1 株を除いて C1、C2 の 2 つのグループに属した。以前の研究で調べられた 149 株の臨床分離株のうち、血清群 1 の株は 123 株<sup>5)</sup>あったが、本研究において調べられた 94 株の血清群 1 の SBT の結果を追加し、計 217 株の SBT の結果による血清群 1 の minimum spanning tree 解析を行ったところ、環境分離株で見出された 8 つのグループのうち S2 を除く 7 つのグ

ループに所属する complex とさらに新しい 1 つのグループ（感染源が不明のものが多いためグループ U と名付けた）が形成された（図 1）。B1、B2、B3 に所属する臨床分離株は浴槽水が感染源と推定・確定される臨床分離株が多く、それ以外のグループに所属する臨床分離株は感染源不明のものが多かった。このことは浴槽水以外の感染源を推定・調査することが難しいことを示しており、感染源不明の事例は、冷却塔水、土壌、未だ認識されていない水系、あるいは土壌が混入した何らかの水系が感染源となっている可能性を示唆する。

そこで、本研究で調べられた環境分離株 91 株（表 1 の 82 株から、1 株しか解析できなかった河川水を除いた 81 株に患者分離株と一致した浴槽水分離株 8 株、シャワー水分離株 1 株、加湿器分離株 1 株の計 10 株を加えた 91 株）を以前解析した環境分離株 134 株（冷却塔水分離株 50 株、浴槽水分離株 50 株、土壌分離株 34 株）<sup>10</sup> に加えた 225 株について minimum spanning tree 解析を行ったところ、以前の解析で見出された 8 つのグループは保持されており、新しく加わった浴槽水分離株も B1、B2、B3 に、冷却塔水分離株も C1、C2 に属するものが多かった。また、新しく菌株が加わったことにより、臨床分離株の解析で見出されたグループ U が環境分離株においても 4 種類の ST により形成されたが、由来は浴槽水、冷却塔水、修景水、シャワー水と異なっていて、グループ U の主要な由来は明確にならな

かった。新たに解析に加えた噴水・修景水分離株は S1 と U に属するものが 1 株ずつあったが、残りはすべて C1 だったので、冷却塔水と遺伝的に似た傾向にあると考えられた。一方シャワー水分離株は B1、C1、S1 と分かれ、遺伝的に分散していたが、その理由は不明である。

## E. 結論

本研究において 112 株の *Legionella pneumophila* 臨床分離株、92 株（感染源調査で分離され、臨床分離株と重複していると考えられる菌株を除くと、82 株）の *Legionella pneumophila* 血清群 1 の環境分離株について SBT 法による遺伝子型別を行った。浴槽関連株とシャワー水分離株は多様であったが、冷却塔関連株はおよそ 7 割が ST 1 となり、やや多様性に乏しかった。噴水・修景水は冷却塔水分離株と似た傾向を示した。環境分離株全体（82 株）では、32 種類の ST が見出された。臨床分離株 112 株は 64 種類に分けられた。臨床分離株の遺伝的多様性はレジオネラ症の主要な感染源である浴槽水に由来する菌株の多様性を反映していると考えられた。Minimum spanning tree 解析を行うと、遺伝子型により、浴槽水分離株あるいは浴槽水が感染源と推定・確定される臨床分離株が多く属する B1、B2、B3 の 3 つのグループ、冷却塔水分離株の多くと感染源不明の少数の臨床分離株が属する C1、C2 のグループ、土壌分離株のほとんどが属する S1、S2、S3 のグループ、感染源不明の臨床分離株と少数の由来が多様

な環境分離株が属するグループUの9つのグループに分けられた。S1に属する臨床分離株は塵埃や土、あるいは浴槽水が感染源と考えられる臨床分離株、また多くの感染源不明の臨床分離株が属していた。S3に属する臨床分離株も見出されたが、S2に属する臨床分離株はなかった。

#### 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・奥野ルミ（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）、上田ひろみ（長野県環境保全研究所）、江川 武・佐々木林子（文京保健所）、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）、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）、高瀬佳彦（荒川区保健所）、田中 忍（神戸市環境保健研究所）、辻 英高（兵庫県立健康環境科学研究所）、床井由紀（宇都宮市衛生環境試験所）、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）、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・吉田英弘（福岡市保健環境研

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-acylneuraminate cytidylyl 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\\_home\\_page.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_home_page.php)
- 4) 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.
- 5) 厚生労働省科学研究費補助金（地域健康危機管理研究事業）「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
- 6) Harrison TG, Afshar B, Doshi N, Fry NK, Lee JV. 2009. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 28:781-91.
- 7) Kozak NA, Benson RF, Brown E, Alexander NT, Taylor TH Jr, Shelton BG, Fields BS. 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.* 47:2525-35.
- 8) Reimer AR, Au S, Schindle S, Bernard KA. 2009. *Legionella pneumophila* monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types isolated in Canada between 1981 and 2009: Laboratory Component of National Surveillance. 2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 29:191-205.
- 9) 磯部順子、金谷潤一：富山県の不明感染源解明のための環境調査。「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」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）、研究代表者：倉 文明。平成 22 年度総括・分担研究報告書。
- 10) 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.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Matsui M, Fujii S, Shiroiwa R, Amemura-Maekawa J, Chang B, Kura F, Yamauchi K. Isolation of *Legionella rubrilucens* from a pneumonia patient co-infected with *Legionella pneumophila*. *J. Med. Microbiol.* 59:1242-6 (2010)
- 2) Chang B, Taguri T, Sugiyama K, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H. Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63:119-23 (2010).
- 3) Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko A, Watanabe Y, Isobe J, Nukina M, Nakajima H, Kawano K, Tada Y, Watanabe H;

Working Group for *Legionella* in Japan. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. J. Med. Microbiol. 59:653-659 (2010)

- 4) 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, 橘洋正, 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)
- 5) 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.
- 6) 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, Kiyomi Kikukawa, Akiko Kaneko, Yuko Watanabe, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Hiroshi Nakajima, Kimiko Kawano, Katsunori Furuhashi, Yuki Tada, Miyo Murai, Bin Chang, and Fumiaki Kura. Sequence types of *Legionella pneumophila* isolates from patients and environments in Japan. 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* infections. Copenhagen, Denmark. Sep 2010.
- 2) 前川純子、菊川紀世己、常 彬、村井美代、山崎利雄: レジオネラ属菌の菌種同定と遺伝子型別. 第 22 回日本臨床微生物学会総会. 2011 年 1 月, 岡山.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Junko Amemura-Maekawa, Kiyomi Kikukawa, J. H. Helbig, Katsunori Furuhashi, Masayuki Ichinose, Atsuko Suzuki-Hashimoto, Bin Chang, Miyo 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.
- 6) 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.
- 7) 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.

#### H. 知的所有権の取得状況

前川 純子、渡邊 治雄、倉 文明、常 彬、  
 森林 敦子、杉江 元、早川 洋一：新規イ  
 ソクマリン系蛍光物質。特許第 4590625  
 号。登録日 2010 年 9 月 24 日。（レジオ  
 ネラ菌体に由来する蛍光物質）

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は、人口当たりの報告数が全国でもっとも多い状況となっている。これまでの調査の結果、患者報告数には地域差が認められることに加え、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。そこで、レジオネラ症の発生の背景を探ることを目的として、以下の調査を行い、成果を得た。

- 1) 感染の地域性とその原因：平成 18～22 年の 5 年間に得られた浴用水の状況とそれらから分離されたレジオネラ属菌を対象に地域間の特性を比較した。その結果、レジオネラ症報告数の多い西部では、患者から分離される頻度の高い *lag-1* を保有する *Legionella pneumophila* (*L.p.SG1* (*lag-1+*)) が遊離残留塩素濃度の高い浴用水から分離されていることが明らかとなった。このことから、塩素消毒により *L.p.SG1* (*lag-1+*) が選択的に生残し、結果として感染の確率を高めている可能性が推察された。
- 2) 不明感染源解明のための環境調査：浴用水以外の感染源を特定するため、水溜りと車のウォッシャー液についてレジオネラ属菌の調査を実施した。平成 23 年度は水溜り 69 検体、ウォッシャー液 31 検体を、平成 24 年度は水溜り 65 検体、ウォッシャー液 106 検体についてレジオネラ属菌の分離を試みた。その結果、水溜り、ウォッシャー液から、平成 23 年度は 33/69 (47.8%)、10/31 (32.3%) が、平成 24 年度は 21/65 (32.3%)、3/106 (2.8%) のレジオネラ属菌が分離された。水溜りから分離されたレジオネラ属菌では *L.p. SG1* が 20.4% ともっとも多く、それらのうち *L.p. (lag-1+)* 保有株が 57.3% と、浴用水のそれ (45.3%) よりも高かった。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。



## 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<sup>1)</sup>が、感染様式や起原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 18~22 年の 5 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、ひとつは、おもな感染源である浴用水の地域性を比較することで、患者発生状況の地域差の原因を明らかにし、さらにレジオネラ症の発生に浴用水がどのように関わっているかを明確にすることを、ひとつは、新たな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

### 平成 22 年度

#### 1) 調査期間および方法

調査は、平成 18~22 年の 5 年間の浴用水のレジオネラ汚染実態調査で得られた浴用水の性状とそれらから分離されたレジオネラ属菌を対象に行った。データは東部（E：朝日町・魚津市・上市町・黒部市・立山町・富山市・滑川市・入善町）と西部（W：射水市・小矢部市・高岡市・砺波市・氷見

市・南砺市）に大きく分けて比較した。はじめに浴用水の遊離残留塩素濃度（残塩）などの特性と分離されたレジオネラ属菌との関連性を調べた。次に、患者から分離される *Legionella pneumophila* Serogroup 1 (*L.p.SG1*) との関連が報告<sup>3)</sup>されている *lag-1* について、患者 24 名および浴用水 55 件から分離された *L.p.SG1* における保有状況を調べた。

#### 2) 患者の発生動向調査資料

富山県感染症情報センターで 1999~2010 年の 12 年間に収集、解析されたデータを用いた。

#### 3) 浴用水の状況調査

県内の公衆浴場およびスポーツ施設 96 施設の浴用水 260 件（東部 122 件、西部 138 件）について調査した。採水は厚生センターおよび浴用施設に協力を依頼した。おもな調査項目は pH、残留遊離塩素濃度（残塩）と、一部の浴用水については、従属栄養細菌数について調べた。

#### 4) 供試菌

患者株は医療機関あるいは当所で、また、浴用水株は当所で分離した。血清型は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）による凝集反応で決定した。また、患者からの分離株 25 株はレファレンス事業として感染症研究所に送付し、Monoclonal Antibodies (MAb) 型別、SBT (Sequence-Based Typing analysis) 型別を依頼した。

5) *lag-1* は Kozak らの報告したプライマー *lag-F*: 5'-CTCACA ACAAGTCAAGCA AC -3' および *lag-R*: 5'-AAACCATACCAAAGC AAC AT -3' を用い、Go Taq HS (プロメガ) 10  $\mu$ l に *lag-F*, *lag-R* (2  $\mu$ M) をそれぞれ

1 $\mu$ l, テンプレート 2 $\mu$ l を加え, 20 $\mu$ l になるよう H<sub>2</sub>O を加え反応液とした. PCR は 95°C2 分, 94°C30 秒, 57°C30 秒, 72°C 1 分を 30 サイクル, 72°C5 分で thermal cycler DICE (takara) でおこなった.

## 平成 23~24 年度

感染源調査として, 過去の報告<sup>4,5)</sup> から, 対象を道路上の水溜りと, 車のウォッシャー液を選んだ.

### 1) 調査期間と試料

①水溜り:平成 22 年 11 月~平成 24 年 8 月までの 1 年 10 か月の間に県内の幹線道路地点 (図 1) で採取した 134 検体について調べた.

②車のウォッシャー液:平成 22 年 6 月~24 年 11 月の間に採取した 137 検体について調べた.

### 2) レジオネラ属菌の分離

レジオネラ属菌の分離は, レジオネラ症防止指針<sup>6)</sup> 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 をメンブランフィルター (直径 47mm, 0.22 $\mu$ m/0.45 $\mu$ 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.

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 $\mu$ 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分離されたレジオネラ属菌の同定:同定は, 平板に発育したレジオネラ属菌様のコロニーについて, 森本の報告<sup>7)</sup> した斜光法

で特異的な形態を観察し, 血液寒天培地と BCYE- $\alpha$  (ビオメリュー) に移植し, システインの要求性を確認した. 次に BCYE- $\alpha$  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:平成 22 年度に同じ

⑤ SBT: *L.p.SG1* について, Sequence Type を決定した. 方法は前川の報告<sup>8)</sup> 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. 結果

### 平成 22 年度

【患者発生動向】1999~2010 年に富山県で報告されたレジオネラ症患者は 126 名で, 市町村別の人口 10 万人対の患者発生数は, 高岡市が 24.5 と最も多く, 次いで氷見市 21.4 の順であった. 全体では, 東部 8.5, 西部 15.1 と西部で高かった (図 2).

【地域別にみた浴用水の残塩とレジオネラ属菌分離状況】

レジオネラ属菌の血清型と分離された浴用水の残塩は, 東部では 0.2mg/L 未満で 17 血清型が 70/107 件 (65.4%) から, 1.0mg/L 以上は *L.p.SG6*, *SG9* それぞれ 1 件 (1.9%) が分離された. 西部では 0.2mg/L 未満で 13 血清型が 59/110 (53.6%) から, 1.0mg/L 以上では 5 血清型が 11/110 (10.0%) から分離された (表 1). 血清型別ごとの残塩の平均は, 西部の *L.p.SG1* が 0.48mg/L と最も高く, 次いで西部の *L.p.SG9* が 0.41 mg/L, 東部

の *L.p.*SG9 が 0.34 mg/L であった。 *L.p.* の主な血清型 (*L.p.*SG1,5,6,9) をみると、有意差があるといえないまでも、西部の残塩 1.0mg/L 以上の高い浴用水で *L.p.*SG1 と SG5 が分離された (図 3)。残塩以外に東西で差がみられる性状に差は認められなかった。

#### 【*lag-1* を保有する *L.p.*SG1 の分離状況に関する地域差】

患者 24 名から分離されたレジオネラ属菌 27 株の内訳は、*L.p.*SG1 が 22 株、*L.p.*SG4 が 2 株、そして *L.p.*SG2, SG3, *L.feeleii* がそれぞれ 1 株であった。*L.p.*SG1 22 株のうち、*lag-1* を保有していたのは 21 株 (95.5%) であった。一方、33 施設 55 浴用水から分離された *L.p.*SG1 の *lag-1* の保有率は、東部が 10/20 件 (50.0%)、西部が 16/35 (45.7%) で、わずかに東部で保有率が高かった。しかし、*lag-1* 保有株と分離された浴用水の残塩には関連性は認められなかった (表 3)。ただし、残塩 1.0mg/ml 以上の浴用水で分離された *L.p.*SG1 は 5/6 (83.3%) が *lag-1* 保有株で、すべて西部地域の浴用水から分離された (図 4)。

平成 23~24 年度

#### 1. 水溜りのレジオネラ属菌分布状況

##### ①水溜りにおけるレジオネラ属菌の検出

27 地点全体におけるレジオネラ属菌の検出率は 54/134 件 (40.2%) で、その菌数は 34/54 (63.0%) が 10-99/100ml であった (図 5)。水溜りからのレジオネラ属菌の検出率は、東部が 24/49 (49.0%)、西部が 30/85 (35.3%) で、差は認められなかった (P=0.32) 平成 23 年度に実施した水たまり調査における気温と菌数の関連性について

てみると、平均気温は 6~8 月に高く、採水した全地点のうち、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、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レジオネラ属菌 401 株の血清群別は、UT を除き、もっとも多かったのは *L.p.*SG1 82 株 (20.4%) で、ついで SG5 が 67 株 (16.7%)、SG8 が 63 株 (15.7%) の順であった。

##### ③ *L.p.*SG1 の *lag-1* 保有状況と ST 別頻度

62 株の ST 別の頻度と *lag-1* について表 2 に示した。*lag-1* を保有していたのは、47/82 株 (57.3%) で、2005~2012 年に浴用水から分離された SG1 の *lag-1* 保有率 24/53 (45.3%) と有意差は認められなかった (P=0.17) (表 3)。また、*L.p.*SG1 の ST ではおよそ 4 割 (34 株) が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 (8 株) であった。この ST120 は、前川ら<sup>8)</sup>によると、患者から分離される *L.p.*SG1 で多く認められる ST の一つで、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レジオネラ属菌の汚染状況

調査したウォッシャー液 137 検体中、レジオネラ属菌が分離されたのは 13 検体 (9.5%) で、その菌数は 10~99cfu/100ml が 7 件、100~999cfu/100ml が 3 件、1,000cfu/100ml 以上が 3 件であった (表 4)。また、分離されたレジオネラ属菌の血清型は 4 株が *L.p.*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. p.* SG1 の SBT の系統樹解析

*L. p.* SG1 について、平成 22 年度の調査で水溜りから分離された 51 株と、これまでに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, 冷却塔由来水 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。浴用施設の利用がなかった 5 名から分離されたレジオネラ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

富山県におけるレジオネラ症の報告数は年間 20~25 名で、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。その他は一

部で土塵などが疑われるが、4 割の患者は感染源が明らかとはなっていない。

感染源のひとつである浴用水に関連して、本調査の結果から、ヒトから分離される *L. p.* SG1 のほとんど保有する *lag-1* 保有株が塩分の高い浴用水から分離されていたことが明らかとなった。そして、これは西部で多く認められたため、西部でレジオネラ症患者が多く報告される原因となっていることと関連するか興味深い。塩素消毒により浴用水の中で *L. p.* SG1 だけが、しかもレジオネラ症に深く関与する *lag-1* を保有する株が選択的に生残する状態となり、感染確率を高めているのではないかと推定された。

一方、感染源が推定されない 4 割の患者から分離された株の多くが、今回の水溜りから分離されたレジオネラ属菌と遺伝的に近い関係にあることが明らかになった<sup>9)</sup>。中には、これまでヒトから分離されたにも関わらず、環境から分離できなかったため、感染源が推定できなかった ST120 株が水溜りから分離されたことで、水溜りがレジオネラ症の新たな感染源と考えられる。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。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かについては、さらに調査が必要であろう。なぜなら、水溜りからもっとも多く分離されたのは前川ら<sup>10)</sup>が土壌に多いことを報告している *L. p.* SG1 の ST48 であった。すなわち水溜りから分離されるレジオネラ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