

象を広げて調査することが重要であると思われる。そのひとつとして、調査した自動車のウインドウウォッシャー液については、*L.p.* SG1 は分離されなかったものの、レジオネラ属菌が分離され、レジオネラ症の感染源に成り得る可能性が示された。なお、専用のウォッシャー液を使用している車からはレジオネラ属菌は検出されなかった。

本報告は、患者から分離されたレジオネラ属菌と比較することで明らかになった事実が多く、これらの菌株が重要であることが再認識された。現在、患者レジオネラ症は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レジオネラ属菌が分離されることは極めて少ない。そのため、菌の分子疫学的解析等ができない状況となっており、感染源の特定が困難となっていることが問題である。レジオネラ症を減少させるために、感染源を特定し、排除することが肝要であることは言うまでもない。医療機関において培養検査が行われることを強く望む。

E. 結論

富山県でレジオネラ症の報告数が多い理由のひとつとして、西部地区での残塩の高い浴用水における *lag-1* を保有する *L.p.* の分布が考えられた。従って、浴用水の衛生管理を塩素剤だけに頼ることは危険であり、今後、塩素剤を用いない衛生管理手法を併用すべきと思われる。そのためには、効率的な塩素剤の使い方など、浴用水の衛生管理基準や管理方法については検討が必要で

ある。

また、水溜りと感染源が推定不能であったレジオネラ症患者から分離されたレジオネラ属菌が遺伝的に近い関係にあることが明らかとなった。水溜りから直接感染するかについては更なる調査が必要であるが、新しい感染源として重要な情報を示すことができた。

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) IASR vol.29, No.12. 327-328. レジオネラ症 2003.1~2008.9
- 2) 金谷潤一ら (防菌防黴学会第38回年次大会抄録 Oa-3) 富山県で分離された *L.pneumophila* 血清群の (SG) 1 の遺伝子解析
- 3) Kozak *et al.*, 2009. *J. Clin. Microbiol.* 47:2525-2535. Distribution of *lag-1* Alleles and Sequence-Based Types among *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Clinical and Environmental Isolates in the United States.
- 4) Sakamoto *et al.*, 2009. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1295-1297, *Legionella pneumophila* in Rainwater on Roads.
- 5) Wallensten *et al.*, 2010. *Eur. J. Epidemiol.* 25:661-665. Windscreen wiper fluid without added screenwash in motor vehicles: a newly identified risk factor for Legionnaires' disease.
- 6) 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, (2009).
- 7) 森本 洋. 分離集落の特徴を利用したレ

ジオネラ属菌分別法の有用性. 日本環境感
染誌 2010 ; 25 (8) 8-14.

8) Junko Amemura-Maekawa, Fumiaki Kura,
Juergen H. Helbig, Bin Chang, Akiko Kaneko,
Yuko Watanabe, Junko Isobe, Masafumi
Nukina, Hiroshi Nakajima, Kimiko Kawano,
Yuki Tada, Haruo Watanabe and the Working
Group for *Legionella* in Japan. 2010. J. Med.
Microbiol. 59. 653-659. Characterization of
Legionella pneumophila isolates from
patients in Japan according to serogroups,
monoclonal antibody subgroups and sequence
types.

9) 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

Jun-ichi Kanatani¹, Junko Isobe, Keiko Kimata,
Tomoko Shima, Miwako Shimizu, Fumiaki
Kura, Tetsutaro Sata, and Masanori Watahiki

10) 前川純子, 倉文明, 常 彬, 遠藤卓郎,
鈴木敦子, 市瀬正之, 菊川紀世己, 古畑勝
則. *Legionella pneumophila* の遺伝子型および
モノクロナール抗体型の解析 - 土壌分離株
および臨床分離株と浴槽, 冷却塔水分離株
との比較 - . 「迅速・簡便な検査によるレ
ジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理
手法に関する研究」厚生労働化学研究費補
助金健康安全・危機管理対策総合研究事業,
研究代表者 倉 文明. 平成21年度総括・
分担研究報告書.

F. 研究発表

学会発表

金谷潤一, 磯部順子, 嶋智子, 木全恵子,

綿引正則, 佐多徹太郎: 富山県内で分離さ
れた *L.pneumophila* 血清群 (SG) 1 の遺
伝子解析. 日本防菌防黴学会第 38 回年次大
会, 2011 年 8 月, 大阪.

論文

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.
Journal of Infection and Chemotherapy.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

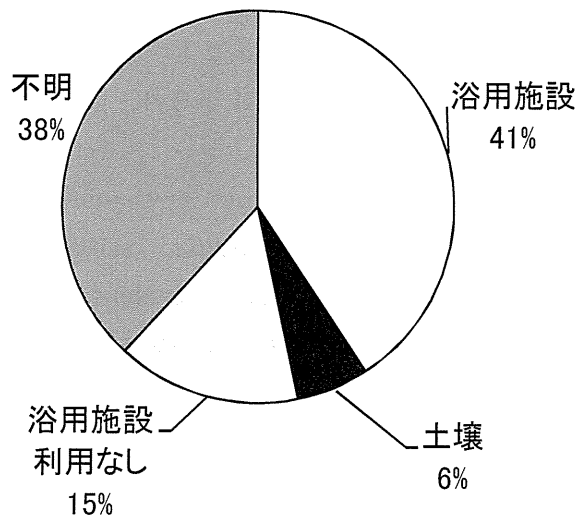


Fig. 1 レジオネラ症患者の感染源調査
(推定含む) 計 155 人
(1999 年～2011 年、富山県内)

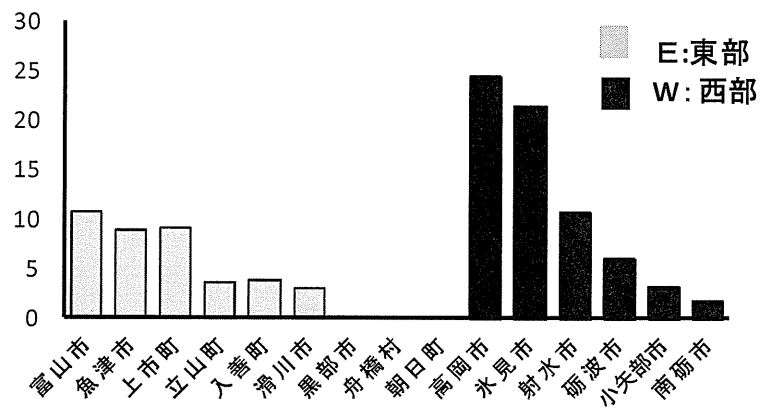


図2. 人口10万人対市町村別レジオネラ症報告数

表 1. 分離されたレジオネラ属菌の遊離残留塩素濃度別浴用水数（東西別）

	EAST(119件)					WEST(142件)					Total
	0≦~<0.2	≧0.2~<1.0	1.0≦	subTotal	平均残塩	0≦~<0.2	≧0.2~<1.0	1.0≦	subTotal	平均残塩	
L.p.SG1	8	12		20	0.29	12	17	6	35	0.49	55
L.p.SG2	3			3	0.02	3	1		4	0.17	7
L.p.SG3	5			5	0.28	5			5	0.18	10
L.p.SG4	6	1		7	0.07	3	1		4	0.15	11
L.p.SG5	7	5		12	0.2	9	5	1	15	0.26	27
L.p.SG6	11	6	1	18	0.26	8	9	1	18	0.33	36
L.p.SG7	1	1		2	0.2	1			1	0.1	3
L.p.SG8	1			1	0	1			1	0.05	2
L.p.SG9	4	4	1	9	0.34	6	3	2	11	0.41	20
L.p.SG10	3	3		6	0.25				0		6
L.p.SG14				0					0	0.6	0
L.p.SG15	1			1	0.1				0		1
SG8/10	1			1	0	2			2	0.07	3
<i>L.micdadii</i>	3	1		4	0.1	3	1		4	0.15	8
<i>L.feelii</i>				0			1		1	0.6	1
<i>L.busaneis</i>	1			1	0				0		1
<i>L.oakridgensis</i>	7			7	0.01				0		7
<i>L.londiniensis</i>	4			4	0.03	1			1	0.16	5
<i>L.pneumophila</i>	4	2		6	0.14	5	2	1	8	0.35	14
Total	70	35	2	107	0.13	59	40	11	110	0.27	217

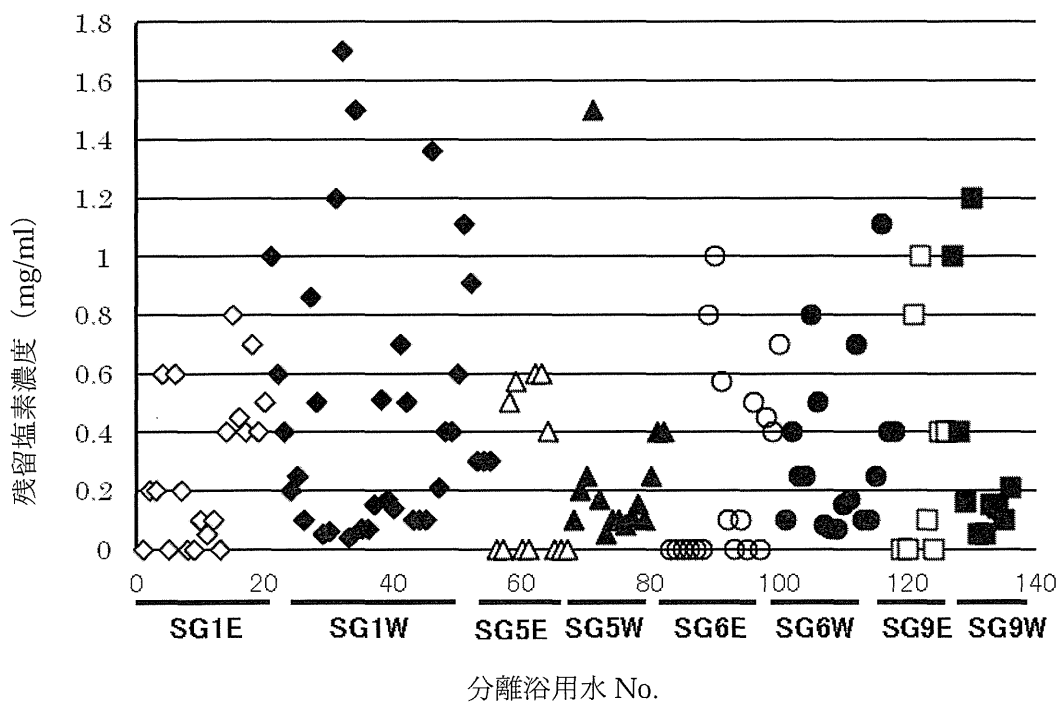


図 3. おもな血清型における分離された浴用水の残塩（東西別）

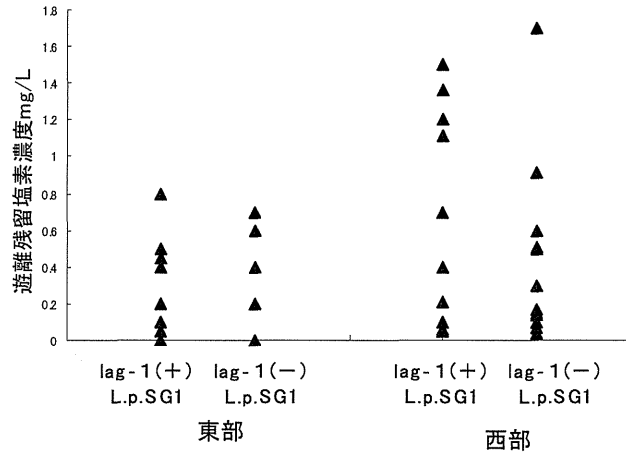


図 4. lag-1 保有 L.p.SG1 が分離された浴用水の残塩の東西比較

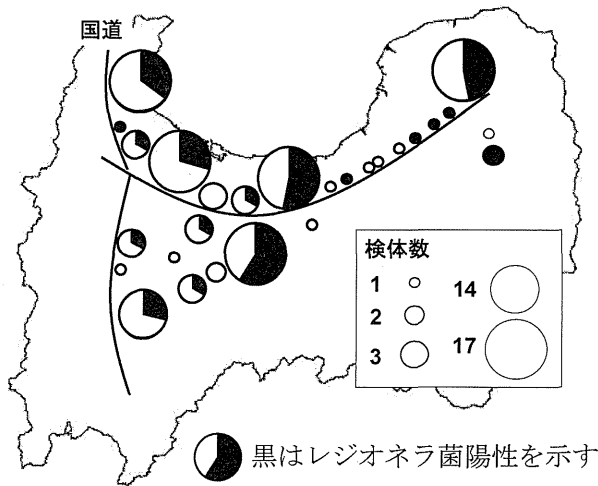


図 5. 水溜まりからのレジオネラ属菌分離率

表 2. 水溜まりから分離された L.p.SG1 の ST と lag-1 保有率

ST	株数	lag-1 +	lag-1 -
48	8	1	7
120	8	8	0
1193*	5	1	4
1204*	5	0	5
89	4	4	0
23	3	1	2
132	3	3	0
493	3	0	3
22	2	0	2
384	2	2	0
507	2	2	0
808	2	0	2
1186*	2	2	0
1187*	2	2	0
1198*	2	2	0
Others#	29	19	10
	82	47	35

* 新規登録 ST

新規登録 ST 18/29 株

表 3. 由来別 L.p.SG1 の lag-1 保有率

由来	株数	lag-1 +	割合
患者	26	26	100%
水たまり	82	47	57.3%
浴用施設	53	24	45.3%
冷却塔	5	0	0%
シャワー水	3	0	0%
合計	169	97	57.4%

表 4. 車のウィンドウウォッシャー液のレジオネラ属菌数

菌数 (cfu/100ml)	検体数
10 未満	124
10 - 99	7
100 - 999	3
> 1000	3
合計	137

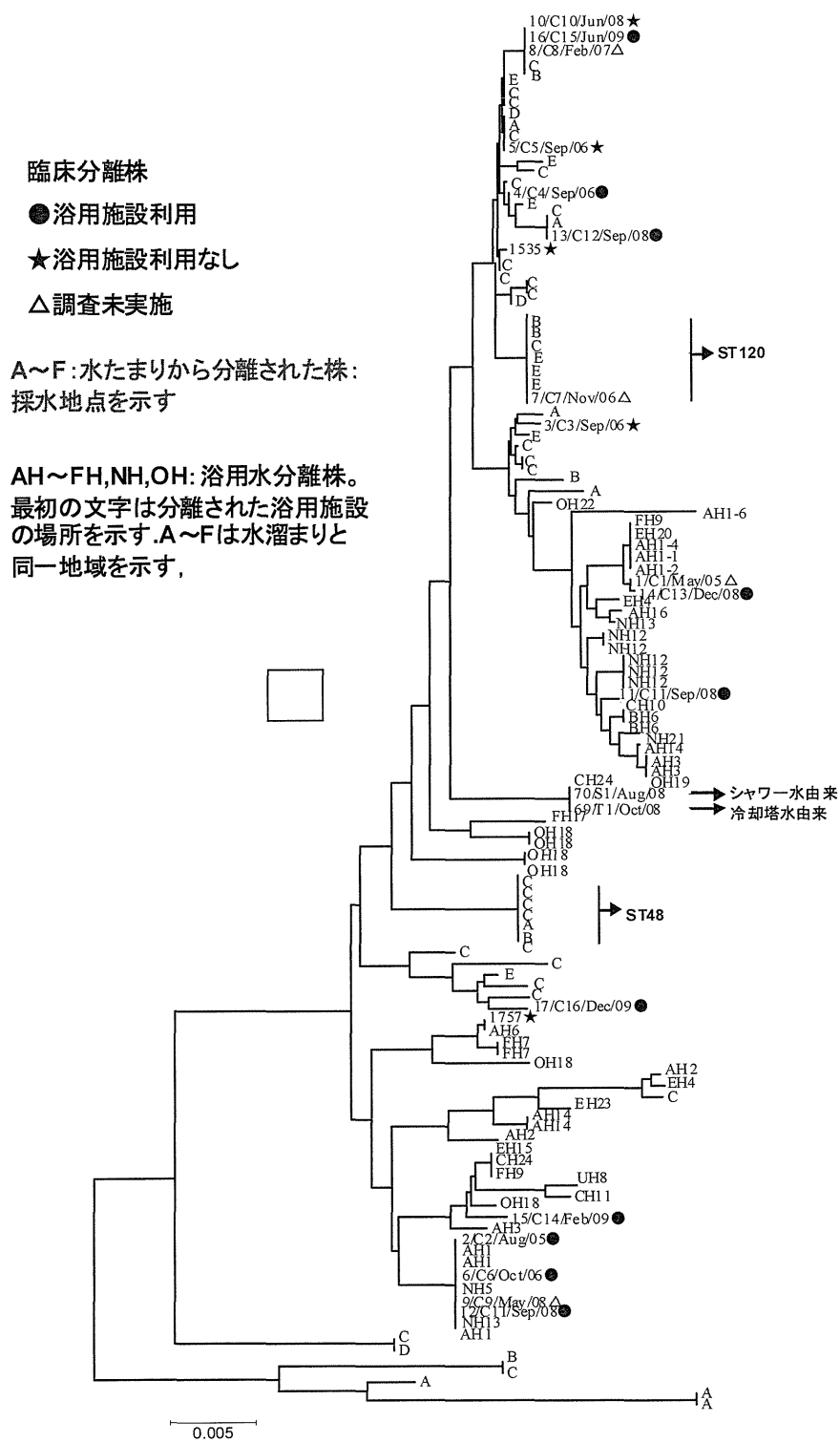


図 6. *L.p.SG1* の SBT 塩基配列の系統樹解析

厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
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 22～24 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。このことから、これらの患者は同一の感染源あるいは環境中に分布した同一の株により感染した可能性が、示唆された。そこで、その感染源を究明するため、Lp SG3 の環境中での分布を調査した。浴槽水等 150 検体を調査した結果、22 検体(14.7%)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 266 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 50 株、原水由来の 6 株、プール水由来の 13 株およびフローミル水由来の 9 株の計 78 株であった。このうちの 57 株と、過去に収集した浴槽水等由来の Lp SG3 12 株、当センターで分離した浴槽水由来の 2 株および患者株 7 株の計 78 株について PFGE 法を行って、PFGE パターンを比較した。PFGE パターンは 26 パターンに分類され、患者株はすべて同一の PFGE パターンであったが、他の株とは一致しなかった。現状では患者の感染源は不明であるが、今後さらに多様な検体について調査を行って、感染源を究明していく必要がある。

の結果、すべての株が同じ遺伝子型に型別

A.研究目的

公衆浴場等入浴施設の衛生管理については、平成 13 年度以来、厚生労働省の研究班に参加して調査研究を行っている。また、中四国ブロックのレジオネラレファレンスセンターとして、患者および環境等由来株の収集、血清群別などを行ってきた。患者由来株は平成 19 年より収集しているが、平成 20 年ごろから *L.pneumophila* (以下、Lp) 血清群(以下、SG) 3 の菌株が多数分離されている¹⁾。国立感染症研究所に依頼して、これらの株の遺伝子解析を行った。そ

の結果、すべての株が同じ遺伝子型に型別され、全国的にも未だ検出されていない遺伝子型であることが分かった。そこで、地域特異的なこれらの菌について汚染実態を調査すると共に、患者の感染源究明に向けた調査を、開始した。

B.研究方法

(1)材料

平成 23 年度および 24 年度に採水した浴槽水等 150 検体について、レジオネラの検査を実施した。また、平成 20 年度か

ら保健所等で分離されたレジオネラ 266 株を収集し、同定および血清型別を実施した。このうち、Lp SG3 と同定された株は、病院で患者から分離されたレジオネラ 26 株のうち、Lp SG3 と同定された 8 株とともに、分子疫学解析を実施した。

(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²⁾を用い、当センターで実施した。

(倫理面への配慮)

患者株の収集にあたっては、患者情報から個人の特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 150 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 22 検体(14.7%)から検出され、浴槽水と原水からは 9.1%および 33.3%、冷却塔水では 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、9、10 とその他のレジオネラ属菌、冷却塔水は Lp

SG1、5、7、13、型別不能とその他のレジオネラ属菌であった。

県内の保健所等が調査して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 266 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、4、5、6、8、9、10、12、型別不能と *L.micdadei* および他のレジオネラ属菌、原水は Lp SG1 および 3、プール水は Lp SG3、5、10、フローミル水は Lp SG3、冷却塔水は Lp SG1、13、型別不能とその他のレジオネラ属菌であった。

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。26 株のレジオネラ菌株はすべて Lp であり、血清群は 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 71

株との関連性を、分子疫学解析により検討した。PFGE 法は患者株 7 株および浴槽水等由来株 71 株について行い、SBT 法は患者株 8 株および一部の浴槽水由来株 7 株のみ実施した。その結果を、表 4 および図 1 に示した。

SBT 法を実施した浴槽水由来 7 株は、ST および PFGE パターンとも患者株と異なっていたが、ST と PFGE パターンに関連性が見られ、同一の ST 株では PFGE パターンも同じであった。ST: 1138、PFGE:11a の 3 株は、ST の新規遺伝子型であった。浴槽水等由来の 71 株の PFGE パターンは 25 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 71 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 22 年～24 年に 85 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。これらは多くの場合、診断に尿中抗原検査を行っているため、患者から原因菌が分離されることはなく、これにより感染源の究明が困難になっている。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)。患者由来株はすべて Lp であり、最も検出頻度の高かったのは SG1(16 株)で、次いで SG3(8 株)、SG2 および SG10(各 1 株)の順であった。SG1 による感染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。病院の検査担当者の話によると、当該病院では、呼吸器内科を受診した患者すべてについて、レジオネラの検査を実施している。そのため、症状の軽い Lp SG3 による感染の場合でも、レジオネラが検出されたものと思われる。

患者株を分子疫学的に解析した結果、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 株ずつであったが、同じ ST 株が検出された患者相互の疫学的な関連は不明であった。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、また 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、本 ST 株が限定された地域に分布しているのかどうかを確認するため、同じ ST 株による患者の発生状況や環境からの分離に注意していく必要がある。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。本菌による患者は、平成 20 年度～平成 24 年度まで長期にわたり発生していることから、感染源の究明が急がれるが、感染源の推定に有効な疫学上の特徴が見られないため、汚染調査を継続実施して、環境中の汚染実態を明らかにしていく必要がある。また、本県で分離された Lp SG3、ST93 による感染患者は、先に述べたように Lp SG1 による感染患者に比べて患者の症状が比較的軽微であったが、ST93 以外の Lp SG3 による感染患者の症状とも比較して、

Lp SG3 による感染症状の特徴づけも必要と考える。いずれにしても、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。今後も、当県の環境中における Lp SG1、ST609 および ST1077、Lp SG3、ST93 を主にしたレジオネラの汚染実態調査を継続し、患者の感染源の究明や環境中でのレジオネラの分布を把握して、感染予防と感染拡大防止に役立てることが重要であると考えます。

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) 県内のレジオネラ症散発患者から *L.pneumophila* が 26 株分離された。
- 2) このうち血清群 1 は 16 株、血清群 3 は 8 株、血清群 2 および 10 は各 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 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.
- 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.

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 浴槽水等のレジオネラ検査結果

検体名	検体数	陽性検体数(%)	菌種	血清群	株数
浴槽水	110	10(9.1)	<i>L.pneumophila</i>	1	3
				2	1
				3	2
				5	2
				6	5
				9	1
			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			
小計	123	12(9.8)			19
冷却塔水	12	10(83.3)	<i>L.pneumophila</i>	1	7
				5	1
				7	1
				13	2
			UT	1	
			<i>Legionella spp.</i>		3
小計	12	10(83.3)			15
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			
小計	15	0			0
計	150	22(14.7)			34

表 2 保健所等から収集したレジオネラ株

検体名	菌種	血清群	株数
浴槽水	<i>L.pneumophila</i>	1	28
		2	4
		3	50
		4	7
		5	26
		6	52
		8	2
		9	9
		10	24
		12	3
		UT	11
		<i>L.micdadei</i>	
	<i>Legionella spp.</i>		1
原水	<i>L.pneumophila</i>	1	1
		3	6
プール水	<i>L.pneumophila</i>	3	13
		5	2
		10	2
フローミル水	<i>L.pneumophila</i>	3	9
冷却塔水	<i>L.pneumophila</i>	1	10
		13	1
	UT		3
	<i>Legionella spp.</i>		1
計			266

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)

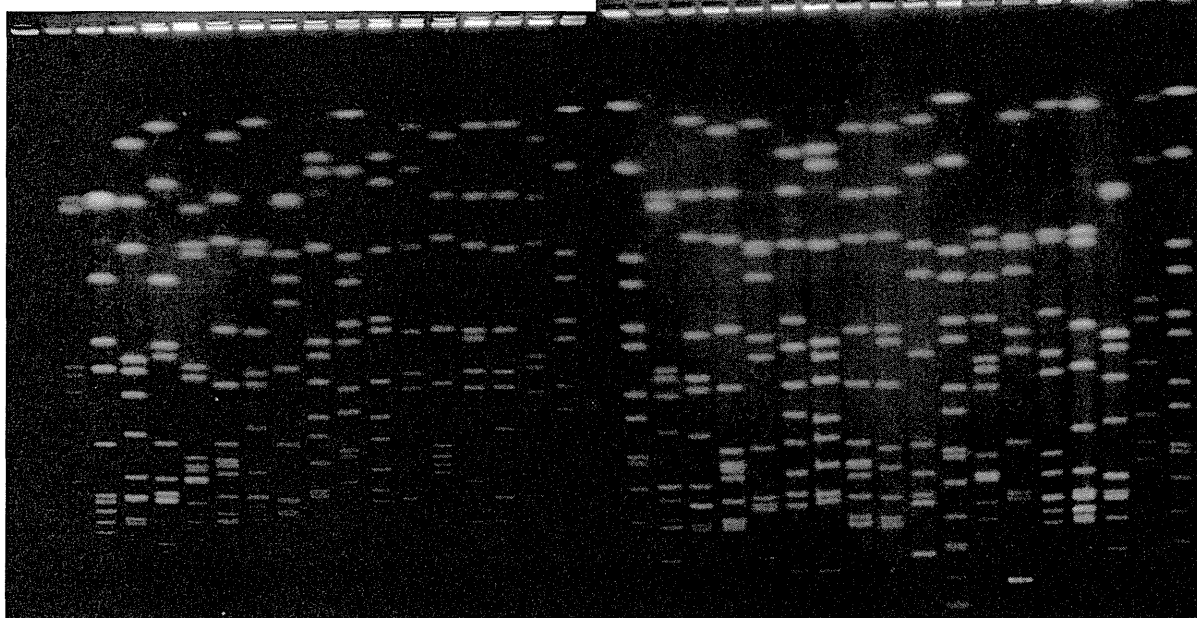
*: neuA増幅せず

①

②

M ★11a11b11c11d11e11f 11g11h M12a12b12c12d12e11bM

M ★ 12g11e12i12j11h12L12m12nM 12p12q12r12s12t 12u M



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

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

No	採取年月日	検体名	地域-施設No	菌数cfu/100ml	PFGE型	ST
8-4	H20.10.21	浴槽水	MA-1	30	12j	未実施
8-5	H20.11.17	浴槽水		30	11e	
9-2	H21.1.21	浴槽水	MA-2	90	11e	
9-1	H21.1.21	浴槽水		50	12q	
9-10	H21.11.26	浴槽水	KC-1	5	11f	
10-2	H22.1.26	浴槽水	MA-3	20	11e	
10-3	H22.6.1	浴槽水	MA-2	15	11e	
10-4	H22.8.17	浴槽水	MI-1	40	11e	
10-6	H22.8.17	浴槽水		40	11e	
10-5	H22.8.17	浴槽水		130	12m	
10-7	H22.8.17	浴槽水		30	12n	
10-9	H22.10.28	浴槽水		BI-1	10	
11-2	H23.2.3	浴槽水	KC-2	220	11g	
11-3	H23.4.11	浴槽水	MA-2	1700	11h	
11-23	H23.4.18	浴槽水	OC	10	11h	
11-15	H23.8.9	浴槽水	OC	10	12L	
11-16	H23.8.9	浴槽水	OC	25	12L	
11-18	H23.8.10	浴槽水	BH-1	2100	12j	
11-17	H23.8.24	浴槽水	OC	120	12b	
11-7	H23.11.1	浴槽水	OC	2000	11d	
11-4	H23.11.21	浴槽水	MA-4	20	11e	未実施
11-5	H23.11.24	浴槽水	OC	50	11a	1138
11-8	H23.11.24	浴槽水	OC	40	11a	1138
11-9	H23.11.24	浴槽水	OC	10	11a	1138
11-6	H23.11.24	浴槽水	OC	10	11b	1137
11-10	H23.11.24	浴槽水	OC	10	11c	614
11-11	H23.11.24	浴槽水	OC	30	11c	614
12-4	H24.5.30	浴槽水	OC	20	12g	未実施
12-3	H24.6.4	浴槽水	MA-5	40	11e	
12-2	H24.6.4	浴槽水	MA-1	20	12i	
12-5	H24.7.4	浴槽水	OC	15	11b	
12-10	H24.7.4	浴槽水	OC	3000	12b	
12-8	H24.7.4	浴槽水	OC	5300	12d	
12-9	H24.7.4	浴槽水	OC	5500	12d	
12-6	H24.7.4	浴槽水	OC	<10?	12e	
12-7	H24.7.4	浴槽水	OC	10	12e	
12-12	H24.7.18	浴槽水	OC		12b	
12-11	H24.7.24	浴槽水	BI-2	200	12a	
12-13	H24.8.27	浴槽水	MA-2	230	12c	
12-14	H24.9.24	浴槽水	MA-1	10	11e	
12-16	H24.9.25	浴槽水	MI-2	30	12b	
12-15	H24.9.25	浴槽水	MI-3	240	12u	
12-17	H24.11.21	浴槽水	KC-3	6250	12i	
LZ 12-1	H24.8.20	浴槽水	OC	10	12e	
LZ 12-2	H24.8.20	浴槽水	OC	10	11b	
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		170	12s	
LZ 12-7	H24.9.25	フローミル		170	12s	
LZ 12-8	H24.9.25	フローミル		170	12s	
LZ 12-9	H24.9.25	フローミル		170	12s	
LZ 12-10	H24.9.25	フローミル		170	12s	
LZ 12-11	H24.9.25	フローミル		170	12s	
LZ 12-12	H24.9.25	フローミル		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 12-20	H24.11.5	ろ過水	OC-3	170	12r	
LZ 12-21	H24.11.5	ろ過水		170	12r	
LZ 12-22	H24.11.5	ろ過水		170	12r	
LZ 12-23	H24.11.5	ろ過水		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		30	12r	
LZ 12-26	H24.11.8	プール水		30	12r	
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	

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22年度～24年度分担総合研究報告書

抗酸菌の調査（*Mycobacterium avium* の遺伝子型）とレジオネラ subspecies 分類法の検討

研究分担者	○山崎 利雄	国立感染症研究所	バイオセーフティ管理室
研究分担者	前川 純子	国立感染症研究所	細菌第一部
研究代表者	倉 文明	国立感染症研究所	細菌第一部
研究分担者	杉山 寛治	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	
研究協力者	小谷野路子	埼玉県立大学健康開発学科	

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。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。また、市販 DDH では、*Legionella pneumophila* までしか同定できないが、DNA-DNA ハイブリダイゼーション法の改良により、*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascullei* の3亜種の鑑別が可能な方法を確立し、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後、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 *L. pneumophila* 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。*L. pneumophila* 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

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¹⁾。しかし、非結核性抗酸菌は、健康人にとっては、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、健康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¹⁾。家庭用の24時間風呂から *M. avium* が検出されたという報告²⁾はあるが、病気との関連は明確に証明されていない。そこで、ヒト、動物、公衆浴場の浴用水等から検出された *M. avium* の縦列反復数可変領域 (Variable Numbers of Tandem Repeats ; VNTR) のパターンを比較する方法^{3) 4)}を用いて、環境中の *M. avium* の分布状況を調べ、*M. avium* 症を引き起こしやすい VNTR パターンの関連性について検討し、公衆浴場等におけるレジオネラ属菌と共に *M. avium* の対策に役立てることを最終目的とした。また、*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⁵⁾ことが知られている。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)⁶⁾は、25菌種のレジオネラ属菌種の鑑別は可能であるが、*L. pneumophila* までしか同定できないので、簡便なDNA-DNAハイブリダイゼーション法により、3亜種の鑑別が可能な方法を確立し、株数を増やしてこの鑑別法の正確さを確認後、*L. pneumophila* の血清群との関連性を検討する事を目的とした。

B. 研究材料と研究方法

1. 抗酸菌の検出と増菌培養

関東、中部、北陸、九州地方の各衛生研究所管内のホテル、旅館、又は、公衆浴場等の浴用水等のサンプル採取を依頼した。採取された浴槽水等の100mlを3000回転30分間遠心検出後の沈渣を、1mlの滅菌精製水に再懸濁した。この懸濁液1mlに等量の4%NaOHを加えて、室温で20分間処理後、このアルカリ処理液0.1mlずつを2~3本の2%小川培地に接種し36±1°Cで培養し、コロニーの出現状況を毎週観察した。コロニー陰性の場合には8週間まで培養した。検出された菌を国立感染症研究所にて、チール・ネルゼン染色法で抗酸菌である事を確認後、滅菌精製水で微濁浮遊液10倍希釈系列で希釈し、それぞれの0.1mlずつをMiddlebrook 7H10寒天培地に接種し、5%CO₂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、純化後、増菌後同定試験に供した。

2. 抗酸菌同定試験

生化学的検査法による同定試験は、極東抗酸菌鑑別セット (極東製薬工業)を用いた。試験操作法、観察判定日、観察判定法は、使用説明書にしたがった。抗酸菌鑑別セット使用による同定試験は、発育速度、集落性状、着色、光発色性試験、p-ニトロ安息香酸 (PNB) 500 µg/ml含有培地上の発育、エタンブトール (EB) 5 µg/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) 500 µg/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)⁷⁾を用いた。DDH試験法の操作、判定は、DDHマイコバクテリア‘極東’ (極東製薬工業株式会社) 使用書に従った。また、16S-rRNAのDNAのシーケンスも行った。

3. 抗酸菌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200 µl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' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') 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 (ペーリンガーマンハイム社) を用いて精製後、Dye terminator cycle sequencing 法にて DNA を標識し、スピンカラム法により未反応の蛍光色素を取り除いた後、ABI310 シークエンサーにてシークエンスをおこなった。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³⁾にしたがったが、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 (φ X174/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、西森等の換算表にしたがって反復配列のコピー数 (TR 数と略す) を求め、アシ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 法により解析した。

6. レジオネラ subspecies 分類法の検討

国立感染症研究所細菌第一部にて保存の *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* (NIIB0001)、*L. pneumophila* subsp. *fraseri* (NIIB0005)、*L. pneumophila* subsp. *pascullei* (NIIB0150) を基準株に用いた。BCYE α 培地にて 35°C で 4 日間培養し、DNA を抽出、精製後、0.5μg をマイクロプレート (Nunc 468667) に固定させた。また、対照として、*E. coli* を固定したマイクロプレートを

作成した。*L. pneumophila* 血清群 1 の基準株および血清群 2 から 15 の参照株、計 18 株 (血清群毎に各 1 株、血清群 5 のみ 4 株) と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定法にて *L. pneumophila* と同定された日本国内の臨床および環境由来株 128 株を用いた。DDH 法のハイブリダイゼーション温度を 50~75°C まで 5°C 間隔で変化させ、ハイブリダイゼーションの時間は、60 分~180 分の 30 分間隔で調べた以外の操作・判定は、市販 DDH レジオネラ '極東' キット (極東製薬工業) の作業手順に従い、市販のキット内の試薬類を用いた。

L. pneumophila の亜種に同定された株については、*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⁸⁾との関連を検討した。

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⁹⁾ 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 1)。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 2)。

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。各株のアシルプロファイルを作り、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(図1)。

3、レジオネラ subspecies 分類法の検討

1) ハイブリダイゼーション条件の検討

L. pneumophila subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascullei* を基準株として固定したマイクロプレートを作成し、ハイブリダイゼーション温度と時間の検討を行った。市販 DDH レジオネラ‘極東’ (極東製薬工業) が指定するハイブリダイゼーション温度である 50°C では、3 亜種の鑑別ができなかった。65°C 以上では、発色が見られなかった。60°C では、特異性は高いが、発色までに 30 分以上の時間がかかるため不正確であり、55°C が適当と思われた。また、ハイブリダイゼーションの時間は、60 分～180 分の 30 分間隔で調べたが、90 分以上は変わらないので、市販キットの条件と同じ 90 分間とした¹⁰⁾。

2) DDH 法によるレジオネラ subspecies の鑑別

L. pneumophila と同定された菌株について、ハイブリダイゼーション温度 55～57°C でハイブリダイゼーションの時間 90 分の条件で DDH 法を行った。*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascullei* としてそれぞれ同定された。また、*L. pneumophila* の 3 亜種は、発色の違いにより肉眼でも明確に鑑別する事ができた¹⁰⁾。

3) DDH 法によるレジオネラ subspecies の鑑別結果と血清群との関連性の検討

DDH 法の結果、血清群 1～15 の基準株・参照株 18 株は正しく鑑別された。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. *pascullei* 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(表 4)。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 *L. pneumophila* subsp. *fraseri* の存在が確認された(表 4)。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。

4) *L. pneumophila* subsp. *fraseri* の由来別の分布
臨床分離株 46 株では subsp. *fraseri* は 1 株 (2%) だけだったが、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) からの分離が多いことが分かった(図 2)。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。

5) 亜種を鑑別した菌株について SBT による遺伝子型の確認

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 subsp. *fraseri* で、それ以外が subsp. *pneumophila* だった(表 5)。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 6)。

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 万人あたり 5.7 人とされている¹¹⁾。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¹²⁾ ので、結核に比べ非核性抗酸菌症の罹患率は低い。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¹³⁾ が、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、関東で多く、粗死亡率では西高東低の傾向がある。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と森本らは報告¹⁴⁾している。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¹⁵⁾。われわれの前回¹⁾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株検出されたが、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検出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. kansasii* 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。

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。しかし、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ため、レジオネラ

属菌対策と同様、こまめな消毒・清掃が重要である。

抗酸菌と同様に日和見感染菌であるレジオネラ属菌のうち、わが国で最も多く検出される *Legionella pneumophila* は、*L. pneumophila* subsp. *Pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascullei* の3亜種に分類されることが知られている⁵⁾。しかし、これらの3亜種を鑑別するには、アイソトープを使ったDNA-DNAハイブリダイゼーションという煩雑な作業が必要であり、一般の検査室では同定できない。簡便な、市販のDDHレジオネラ‘極東’キットでは、*L. pneumophila* までしか同定できないので、DNA-DNAハイブリダイゼーション法の改良により、3亜種の鑑別が可能かどうかを検討した。それぞれの基準株をプレートに固着させ、被検菌から抽出したDNAと55~57°Cで90分間ハイブリダイゼーションを行わせることにより、*L. pneumophila* の3亜種を鑑別することが可能になった。*L. pneumophila* subsp. *pneumophila* は、4, 5, 15を除く1-14の血清群で、*L. pneumophila* subsp. *fraseri* は、4,5,15の血清群、*L. pneumophila* subsp. *pascullei* は5の血清群のみであると報告されている。実際に、*L. pneumophila* と同定された血清群1~15の基準株・参照株18株と国内分離株109株についてDDH法を実施し、*L. pneumophila* の血清群と亜種の関連を検討したところ、血清群と亜種に相関は見られなかったが、*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、繊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

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。結核菌(*M. tuberculosis*)は、検出されなかったが、*M. avium* 27 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℃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。

L. pneumophila subspecies の同定は困難であるが、*L. pneumophila* subsp. *pneumophila*、*L. pneumophila* subsp. *fraseri*、*L. pneumophila* subsp. *pascullei* の 3 亜種は、DDH 法を用いて簡単に鑑別同定する事ができる方法を確立した。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。しかし、*L. pneumophila* の血清群と亜種に相関は見られなかった。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) 山崎利雄、杉山寛治、大畑克彦：浴槽水からの抗酸菌の検出状況と検出株の同定。厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)「循環式浴槽における浴用水の浄化・消毒方法の最適化に関する研究」主任研究者遠藤卓郎、平成 16 年度～平成 18 年度総合・分担研究報告書 p 67-73
2) 斉藤肇、村上 和保、石井則久、榎 赫圃、「24 時間風呂」からの *Mycobacterium avium* complex の検出、結核 75 : 19-25、2000
3) 西森 敬、内田郁夫、田中 聖、西森知子、今井邦俊、柏崎佳人、村田典久、神間清恵、VNTR

(Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル、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) Don J. Brenner et al., *Legionella pneumophila* serogroup lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* subsp. nov., *L. pneumophila* subsp. *fraseri* subsp. nov., and *L. pneumophila* subsp. *pascullei* subsp. nov. J Clin. Microbiol.:1988 Sep;26(9):1695-1703

6) DDH レジオネラ‘極東’(極東製薬工業株式会社) 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) http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php

9) 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

10) 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.

11) 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.

12) <http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/toukei/adddata/> 資料編表 6 新規登録結核患者数および死亡率の年

次推移

1 3) 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.

1 4) 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 5) 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、倉 文明、循環式浴槽における浴用水の抗酸菌の検出調査、第80回実験結核研究会総会、2010年5月

2) 山崎利雄、臨床、動物、公衆浴場の浴用水等から検出された*Mycobacterium avium*におけるVNTR法による検討、第86回日本結核病学会総会、2011、6月、東京

3) 山崎利雄、杉山寛治、前川純子、泉山信司、遠藤卓郎、倉 文明、臨床および循環式浴槽水等から検出された*Mycobacterium avium*の縦列反復数可変領域 (VNTR) を用いた解析、第81回実験結核研究会、2011.6月、東京

4) 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

H. 知的所有権の取得状況

なし