

研究代表者 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究要旨： レジオネラは培養期間が長いので、迅速検査が工夫されてきたが、浴槽水を検体とした生菌の検出にはさらに簡便性が求められている。培養法は検査機関で結果が異なり、検査法の標準化と外部精度管理が必要である。また、欧米でモノクロラミン消毒の有効性が給湯水系で報告され、日本でもモノクロラミンによる消毒でレジオネラ汚染が抑制されることが複数の入浴施設で観察されたが、泉質に応じた適用の検討が必要である。そこで、以下の検討を行い、成果を得た。

- 1) 静岡県内3ヶ所のpH7.3～9.0の循環式温泉入浴施設において4週間以上検証し、浴槽水のモノクロラミンを3mg/L程度に維持することで、浴槽水、ろ過器内水のレジオネラ属菌を不検出(10CFU/100mL未満)に維持することが出来た。従属栄養細菌、アメーバも不検出であった。
- 2) 終濃度約20 mg/Lの高濃度モノクロラミンによる配管洗浄を3ヶ所で実施し、ろ過器の逆洗水とヘヤーキャッチャー接続配管内部の拭き取り検体において、洗浄後に従属栄養細菌数の大幅な減少が確認され、その洗浄・殺菌効果が高いことがわかった。
- 3) 井水の沸かし湯を使用する施設のヘヤーキャッチャー接続配管内部の拭き取り検体を使って、モノクロラミン維持濃度(3 mg/L)における配管内のバイオフィーム制御効果を調べた。浴槽水を遊離塩素管理からモノクロラミン管理に切り替えた後の配管内面の従属栄養細菌数は大幅に減少し、バイオフィーム除去、付着防止効果が認められた。一方、遊離塩素管理を継続した対照浴槽の配管内部の従属栄養細菌数にはそれほどの減少はみられず、浴槽水のモノクロラミン消毒は遊離塩素消毒に比べバイオフィーム制御効果が高いことが示唆された。
- 4) 泉質によるモノクロラミンの安定性について7源泉水で実施し、**硫化水素を含む温泉**の場合は遊離塩素添加時と同様なモノクロラミン濃度の大幅な減少がみられた。
- 5) 塩素消毒に影響するとされる**アンモニア態窒素、ヨウ化物イオン、臭化物イオン、フミン酸、硫黄、鉄イオン**を選び、これら因子がモノクロラミンに与える影響を確認するため、各因子と混合したモノクロラミンと遊離塩素の濃度の推移を測定した。アンモニア態窒素とフミン酸はモノクロラミンへの影響がほとんど見られなかったが、遊離塩素は急減した。鉄イオンは、遊離塩素だけではなく、モノクロラミンへの影響が見られたが、添加直後の消失はモノクロラミンのほうが影響は小さい傾向が見られた。ヨウ化物イオンと臭化物イオンが存在する泉質では、正しい遊離塩素消毒と濃度測定ができていない恐れが考えられた。硫黄はいずれの消毒でも、添加直後に急速な塩素の消失が確認された。塩素の消費後は、濃度は安定した。
- 6) **モノクロラミン消毒は遊離塩素消毒に比べ、温泉水中の消毒副生成物を低減させる**ことができた。ヨウ素化消毒副生成物の分析法を開発し、**ヨウ素イオンが存在する温泉水**では有害性が十分明らかにされていないヨウ素化消毒副生成物(ヨウ素化トリハロメタン類及びヨウ素化ハロ酢酸類等)が増加していることがわかった。
- 7) **冷却水におけるレジオネラ属菌の検出実態を解析し、2001年から2012年にかけて、30%程度から25%弱に漸減しているが、使用殺菌剤の種類別検出率から、塩素系殺菌剤はレジオネラ属菌を抑制できていないことが明らかになった。**また、冷却水中のレジオネラ属菌の菌種を、

培養法と EMA (Ethidium monoazide) -q PCR 法で調査した結果、冷却水には既存種に分類されないレジオネラ属の生菌が多く存在することが示された。モデル冷却塔を用いて実際の冷却水と同様の運転条件を再現し、殺菌剤の種類別レジオネラ属菌抑制効果を評価したところ、遊離塩素を常時 0.2mg/L 以上維持した場合とイソチアゾリン製剤処理は、20 週間にわたりレジオネラ属菌を抑制した。

- 8) レジオネラ属菌迅速検査法の標準化に向け、現在市販されている迅速検査キット（生菌と死菌の両方を検出する qPCR 法及び LAMP 法）及び生菌迅速検査キット（生菌特異的検査法として新規に開発された LC (liquid culture) EMA-qPCR 法）の 3 法について、浴槽水等の実試料を用い、平板培養法に対する感度、特異度等の評価を行った。生菌を検出する迅速検査では、死菌由来 DNA を EMA で修飾して PCR 増幅を抑制し、液体培養と組み合わせて生菌由来 DNA のみを選択的に検出する。qPCR 法と LAMP 法は同等の成績が得られることが確認された（131 検体で感度 100%、特異度 53.6%~57.0%）。生菌迅速検査キットを評価するため、この 131 検体で平板培養法に対して、LC EMA-qPCR 法は感度 100%、特異度 69.9%であったが、ROC 解析により 1CFU 相当/100mL を陽性とするを感度 97.4%、特異度 80.6%のように特異度に改善が認められた。LC EMA-qPCR 法の感度をあげるため **EMA 処理前に活性炭を除く遠心**を提案した。市販迅速検査キットを用いる際は、各検査キットの特徴を理解し、目的に応じて使い分けることが重要と考えられた。
- 9) 39 地衛研を対象に水中レジオネラ属菌数の外部精度管理を実施した。**菌数を任意に設定したシスメックス社のバイオボール**をメーカーが参加機関に発送対応した。本研究班の精度管理ワーキンググループが推奨する標準的な検査法（非濃縮/濃縮、未処理/酸処理/熱処理の 6 通り）では、適切な結果が得られた。どの検査手順を減らすとどの位測定値が低下するか示した。富山県と九州地方で**民間検査機関向けの研修会**を実施し要領を把握した。
- 10) 厚労省のレジオネラ対策の HP にある「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル」の改訂案を作成した。検査でレジオネラが検出された時に、現場をいかに調査し除染するか、環境衛生監視員や施設管理者向けに、実例をとおして読みやすいブックレット「**レジオネラ症対策のてびき**」を出版した（日本環境衛生センター）。
- 11) 主たる起因菌 *L. pneumophila* (*Lp*) について、新しい *neuAh* プライマーを利用した **sequence-based typing** を行い、菌の生息環境と関連した疫学状況を調査した。このプライマーによりこれまで増幅できなかった *neuA* の配列が決まり ST (sequence type) が決定できた。今年度は、臨床分離株 55 株を型別した。散発事例と見られていた事例の中に集団感染事例が見出された。*LpSG12* による感染症例を日本で初めて報告した (Nishizuka M, J. Infect. Chemother. in press)。
- 12) 富山県内の菌株の分離状況を発表した (J. Infect. Chemother. 19:644-652, 2013; Appl. Environ. Microbiol. 79:3959-3966, 2013)。県内の種々の感染源（庄川流域の ST505 等）を特定するため、今年度シャワー水 32 検体、車のウォッシュ液 41 検体、**河川水** 25 検体、土壌 20 検体についてレジオネラ属菌の調査を実施した。その結果、各各 25%、2.4%、28%（アメーバ培養法）、40%（アメーバ培養法）からレジオネラ属菌が分離された。
- 13) 倉敷周辺には ST93 (*LpSG3*; 感染症学雑誌 85:373-379, 2011) による症例が多い。今年度は浴槽水等 140 検体からの 46 株の *Lp* と、保健所等が分離した 79 株の *Lp* の内、*LpSG3* が 22 株あった。それらを含むこれまでの *LpSG3* 分離株 131 株について PFGE 型を検査した。しかし、ST93 の生息環境は未だ不明である。*LpSG1* の遺伝子型 ST609, ST1077 も ST93 と同様の ST グループに属し風呂由来株の

STとは異なるので、保健所の協力を得て浴槽水以外の調査も行っていく。

- 14) これまであまり調査されてこなかった感染源・リザーバーとなりうる環境として、**一般家庭内を網羅的に調査**して水槽、洗面所、散水ホースからレジオネラを検出した。
- 15) レジオネラが増殖するアメーバの宿主-寄生体関係を、生息環境との関連で検討した。今年度は、STグループが明確に異なる土壌と冷却塔水由来の **Lp の 3 亜種のアメーバへの障害性**を検査した。Lp の 3 亜種全てで増殖できる抵抗性のアメーバ、*pneumophila* で増殖できないアメーバ、*pneumophila* と *fraseri* で増殖できないアメーバ、*pascullei* を含め 3 亜種すべてで増殖できないアメーバ等の株がみられた。
- 16) 福岡市のレジオネラ症防止のための研修に対応した。厚労省の生活衛生関係技術担当者研修会において成果を解説した。大分県環境監視員を対象に 2 回研修を行った。

研究分担者・所属機関及び職名

前川純子・国立感染症研究所主任研究官  
八木田健司・国立感染症研究所主任研究官  
神野透人・国立医薬品食品衛生研究所室長  
荒井桂子・横浜市衛生研究所医務職員  
磯部順子・富山県衛生研究所副主幹研究員  
緒方喜久代・大分県衛生環境研究センター  
専門研究員  
黒木俊郎・神奈川県衛生研究所部長  
鳥谷竜哉・愛媛県立衛生環境研究所  
疫学情報科長  
中嶋 洋・岡山県環境保健センター  
特別研究員  
森本 洋・北海道立衛生研究所主査  
縣 邦雄・アクアス(株)つくば総合研究所所長

法のキット化を行なってきた。このような迅速検査の普及とそのための改良が望まれている。

現行の塩素消毒法は遊離残留塩素によっており、不連続点処理が前提となっている。しかしながら、泉質、ろ過槽の活性汚泥、配管系のバイオフィーム、あるいは入浴者自体による塩素消費などが想定され、不連続点処理は困難である。結合型塩素であるモノクロラミンは配管系におけるバイオフィーム対策として米国等では遊離塩素に代えて水道水の消毒剤として用いられ、レジオネラによる院内感染を抑制している実績がある。モノクロラミンを入浴施設の浴槽水の消毒に応用するのは我々が初めてである。すでにモノクロラミンの注入・測定自動化を行い、モデル浴槽を含む複数の入浴施設でレジオネラ不検出として、有効性を確認できた。静岡市ではモノクロラミンの使用が条例で認められた。今年度は、モノクロラミンによる配管洗浄やモノクロラミン消毒時のバイオフィームの状態、泉質によるモノクロラミンの安定性の検査、消毒副生成物の調査を行なった。

水中のレジオネラ属菌数検査の外部精度管理はヨーロッパや米国 CDC で行われている。現在、環境水中のレジオネラの検査法は公定法ではなく指針で示されている。検査法の明確化、明確化された検査法の研修による普及を経て外部精度管理を運用するのが妥当と思われる。本研究では、精度管理上の問題点を改良し、精度管理が事業として継続できることを目指し、外部精度管理用の試料を作製し、研究班内で実施して問題点を検討する。今年度は試料の作製と配布をシスメックス社のバイオボールを利用して行なった。

さらに、わが国においてレジオネラ症の主要な感

A. 研究目的

平成 25 年には過去最高の 1,111 例のレジオネラ症が届けられている。平成 15 年 2 月に公衆浴場における衛生管理要領等が改正され、レジオネラ属菌にかかる規制や浴槽水の消毒方法が明記されたが、小規模の集団感染事例は近年も引き続き起こり、現場の衛生管理の改善が求められている。

レジオネラは環境中に広く存在するため浴槽への混入を防ぐ事は難しく、浴槽水中の菌量を算出し、衛生管理の指標とすることが必須である。しかし、レジオネラが増殖は遅く培養期間が長くかかる。そこで、浴槽水中のレジオネラについて、生菌の DNA を選択的に増幅する新たな遺伝子検査法 (EMA-qPCR) や短期液体培養を組み合わせた PCR

染源は温泉などの入浴施設であると推測されているが、感染源の不明な例も多い。そこで、レジオネラ症の起因菌株について、レジオネラレファレンスセンターにおいて収集し、遺伝子型別 (SBT) を行った。また不明感染源の探索のため環境水の調査を岡山県と富山県の地域、神奈川県的一般家庭で行った。

## B. 研究方法および材料

### 1. 温泉水におけるモノクロラミン濃度の安定性、配管洗浄

8ヶ所の温泉源泉水 (浜松市内1検体、静岡市内5検体、静岡県内1検体、横浜市内1検体 (いわゆる黒湯)、表1) と、入浴剤 (硫黄の湯) を使った浴槽水1検体について、各100 mLをポリエチレン容器に入れ、モノクロラミンまたは次亜塩素酸ナトリウムを3 mg/Lとなるよう添加し、40°Cのウォータバスに浸漬して保温し、一定時間ごとに、全残留塩素濃度 (一部、モノクロラミン濃度) と遊離塩素濃度を測定した。

モノクロラミン濃度はインドフェノール法 (HACH社ポケット水質計) で、遊離塩素濃度はジエチル-p-フェニレンジアミン (DPD) 法 (共立理化パックス) で測定した。

循環式の静岡市内2営業施設 (S温泉、Y温泉使用施設) と浜松市内1営業施設 (井水沸かし湯使用施設) の計3施設において、約20 mg/Lの高濃度モノクロラミンによる配管洗浄を実施した。20 mg/Lの高濃度モノクロラミンはバケツ内の水道水100 Lに、浴槽水の水量10トンに対し12%次亜塩素酸ナトリウム1.67 L、20%塩化アンモニウム1.88 kgを順次添加し、2,000 mg/Lのモノクロラミン溶液を調製後、直ちに浴槽水へ投入し、一晚または1時間配管系内を循環した。

塩素消毒に影響するとされるアンモニア態窒素、ヨウ化物イオン、臭化物イオン、フミン酸、硫黄、鉄イオンを選び、モノクロラミン溶液または遊離塩素溶液を各試験溶液に3 mg/L (フミン酸は5 mg/L) となるように添加後、40°C湯浴内に静置させ、一定時間経過ごとに塩素濃度を測定した。モノクロラミンの測定にはインドフェノール法を、遊離塩素と全

塩素の測定にはDPD法を使用した。なお、DPD法では、結合塩素濃度は、 $\text{NH}_2\text{Cl}/\text{NHCl}_2$ にIを加えて、HOIに変化させ、HOIがDPDと反応した量から算出される原理上、元々存在していたHOIは、遊離塩素として検出されるため、遊離塩素のみ測定するのは困難であることが実験後に判明した。モノクロラミン測定のインドフェノール法では、HOIが検出されず、測定は正確と考えられる。

### 2. 浴槽水の検査

4ヶ所の地方衛生研究所において、平成25年度に入浴施設から188件の試料 (浴槽水149件、原水39件) を採取し、遺伝子迅速検査法の検討に用いた。水質は温泉が50.0%、白湯が47.9%、薬湯が2.1%であり、浴槽水の使用形態は、循環式が94.6%、掛け流しが2.7%、毎日換水方式 (非循環) が2.7%であった。

遊離残留塩素濃度はDPD法で現場で測定した。500 ml~1500 mlの浴槽水をろ過濃縮 (ADVANTECあるいはミリポア ISOPORE; 直径47 mmのポリカーボネート0.2  $\mu\text{m}$ 、0.4  $\mu\text{m}$ ) した。ろ過のできなかった薬湯等の一部は遠心濃縮した。培養法はGVPC培地で37°C、5~7日間培養した。一部にはWYO $\alpha$ 培地やMWY培地も用いて比較した。

平板に発育した*Legionella*属菌様のコロニーについて、森本の報告した斜光法 (環境感染誌25:8-14, 2010) 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 (Oxoid) 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。

一般細菌数は標準寒天培地で36°C2日間培養後、従属栄養細菌数はR2A寒天培地で42°C7日間培養後の菌数を求めた。ATP量の測定は、携帯用簡易測定器ルミテスターPD-10及びルシバックワイド (キッコーマン) を使用し、検水100倍濃縮液100  $\mu\text{l}$  から検水10 ml当たりのRLU値を求めた。

DNA増幅法としては、リアルタイムPCR (サイクリングプローブ法と通常のプローブ法) やLAMP法を用いた。サイクリングプローブ法は、RNAと

DNA からなるキメラプローブと RNase H の組合せにより蛍光を検出し、高感度で非常に配列特異性が高い。LAMP 法は、被検試料を恒温で培養し、濁度測定によってレジオネラを検出する迅速簡便な方法である。今年度の方法は、16S rRNA 遺伝子を標的にしている。

### 3. 消毒副生成物の測定

モノクロロアミン・ジクロロアミン・トリクロロアミンの分別定量は、米国の Standard Methods (第 21 版、2005) の DPD を用いた硫酸第一鉄アンモニウム (FAS) による滴定法 (DPD/FAS 滴定法) に準じて行った。トリクロロアミンの濃度測定は、高感度測定可能な HS-GC/MS 法 (ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析法) を併用した。浴槽水を輸送し、実験室 (国立保健医療科学院) で実施した。

入浴者が経気道および経皮的に取り込む化学物質暴露を評価するため、浴槽水中と浴槽室内空気中の消毒副生成物 (トリクロロメタン、ブロモジクロロメタン、ジブロモクロロメタン、トリブロモメタンのトリハロメタン類 4 物質およびジクロロアセトニトリル、ブロモクロロアセトニトリル、ジブromoアセトニトリルのハロアセトニトリル類 3 物質) の定量を行った。これらの測定は、国立医薬品食品衛生研究所で実施した。気相のサンプリングは現場で行い、濃縮物を冷蔵で輸送し、すみやかに試験した。

### 4. 冷却水のレジオネラ属菌検出データの解析

2001 年 1 月から 2012 年 12 月にかけて日本全国の建築物 (ビル) や工場、医療施設、商業施設等の冷却水を採水し、アクアス (株) つくば総合研究所で検査した結果を解析した。採水には 25 %チオ硫酸ナトリウム水溶液を 1 mL 添加して高圧蒸気滅菌した 500 mL 容のポリプロピレン製容器を用いた。採水時、冷却水で使用している殺菌剤の種類が明確な場合は、採水者が検査依頼ラベルに殺菌剤の種類を記載した。採水した試料水は冷蔵状態 (4~6°C) で保存し、速やかに検査した。

実際に運転されている冷却水 3 検体を採取して、培養法によるレジオネラ属菌検出を行い、菌種を同定した。同じ試料水について、レジオネラ属菌特異

的 16S rRNA 遺伝子を標的とするプライマー及び *L. pneumophila* 特異的 *mip* 遺伝子を標的とするプライマーを用いた EMA (Ethidium monoazide) -qPCR 法 (タカラバイオ Thermal Cycler Dice Real Time System II) で測定を行ない、各遺伝子量を求め、レジオネラ属菌の生菌に占める *L. pneumophila* の存在比率を求めた。また、EMA 処理後の試料について、16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーを複製し解析した。

### 5. LC EMA-qPCR 法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の検討

迅速検査法は、qPCR 法として Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (CY240、タカラバイオ) を使用し、DNA 抽出には Lysis Buffer for *Legionella* (9181、タカラバイオ) を用いた。LAMP 法として Loopamp レジオネラ検査キット E (LMP661、栄研化学) を使用し、DNA 抽出にはキット添付のアルカリ熱抽出試薬を用いた。いずれも各キットのマニュアルに従い操作を行った。

生菌迅速検査は Viable *Legionella* Selection Kit for LC EMA-qPCR (7730、タカラバイオ)、*Legionella* LC Medium base (9016、タカラバイオ)、Lysis Buffer for *Legionella* (9181、タカラバイオ)、Cycleave PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit (CY240、タカラバイオ) をマニュアルに従い使用した。ATP 値が 5,000 RLU/100ml 以上の検体は、1,000 倍濃縮液及び 100 倍濃縮液の両方について検査を実施し、定量値の高い値を採用した。

リアルタイム PCR 装置は Thermal Cycler Dice Real Time System (TP900 あるいは TP800、タカラバイオ) を使用し、キットのマニュアルに記載された方法でコピー数から CFU に換算した。

SPSS Statistics 19 (IBM) を用い、平板培養法におけるレジオネラ属菌検出を従属変数、迅速検査法の定量値を独立変数とした ROC 曲線を作成し、迅速検査法のカットオフ値を決定する指標とした。

アメーバ培養レジオネラは、PYGC 培地で 30°C 4 日間培養した *Acanthamoeba castellanii* Neff strain (ATCC 30010) に、BCYE $\alpha$  寒天培地で 30°C 4 日間培養した *Legionella pneumophila* 長崎 80-045 株を接

種し、3 時間後に Page's amoeba saline で洗浄後、30°C で 2 日間培養した。得られたレジオネラ菌液を孔径 5µm のメンブレンフィルターでろ過し、アメーバの残骸等を除去したろ液を 1/50 PBS で洗浄後、実験に用いた。加熱死菌の調製は、70°C 30 分間処理した。

改良試験法では、試験菌液あるいは 1000 倍濃縮試料 100µl に液体培地 900µl を加えて 36°C、18 時間培養後の増菌液を 500 x g、15 秒遠心し、上清 100µl を分取し、EMA 処理以降の操作を行った。

## 6. 外部精度管理

配付試料は、安定性、再現性、妥当性等のバリデーションを確保し、それらを多数作製した場合の品質管理も必要になることから、そのような試料作製ノウハウを持った民間企業との協力がこれまで課題であった。そこで、微生物定量試験用標準菌株として過去レジオネラ属菌の販売実績があるシスメックス・ビオメリュー社と BioBall 作製に係る協議を行った。供試菌株は、過去の販売実績において安定性が確認されている *L. pneumophila* ACM5197 を使用した。菌数は、15000 cfu/Ball (水 500ml に溶かした場合、3000 cfu/100ml) で発注した。この菌数は、一般的な検査手技において、分離平板上のコロニー数が、理論上、非濃縮検体で 3 コロニー、100 倍濃縮検体で 300 コロニー発育することを意味している。発注の結果、製品保証として、平均値 16916.0 cfu/Ball、95%信頼区間：下限値 9875.3 cfu/Ball、上限値 23956.7 cfu/Ball の製品(保証期間：2013 年 9 月 18 日～2014 年 9 月 18 日)が納品(図 9)された。メーカーから外部精度管理参加機関に直接納品された。

国立感染症研究所の「病原体等安全管理規定」を参考としているシスメックス・ビオメリュー社が求める BioBall 使用要件 1. 病原体のバイオセーフティレベル(以下 BSL)規定について、2. 施設要件、4. 作業従事者要件を満たし、BioBall 使用承諾書に署名できる機関であることとした。

ワーキング・グループ(WG)構成機関である 10 カ所の地方衛生研究所及び全国地方衛生研究所の 6 ブロックから参加機関を募り、計 39 カ所で外部精度管理を行った。これらの参加機関に 1～39 までの数字をラン

ダムに振り分け結果集計を行った。WG のみで行った結果集計においては、A～J までのアルファベットをランダムに振り分けた。検査は、各参加機関の検査作業書に従って実施した。また、WG メンバーを中心に 11 機関に対し WG 推奨法での検査実施も依頼した。

メーカー保証による 95%信頼区間の上限値と下限値をレジオネラ属菌検査で使用される、検体 100ml 中の cfu(colony forming unit)に換算すると、下限値 1975.06、中央値 3383.2、上限値 4791.34cfu/100ml となった。非濃縮検体においては、分離平板上の 1 集落を 1000cfu/100ml と換算することから、結果は 1000 cfu の整数倍となる。このことを勘案し、前述の 100 ml 中の cfu を補正すると、1000 ～ 5000 cfu/100ml となる。さらにこの範囲に対し、「Xbar 管理図における管理線を理化学調査では添加量の 70%および 120%、微生物学調査では全体の平均値の 30%および 300%」という考え方を参考に、本外部精度管理では、「メーカー保証されている菌数をベースに補正した範囲に対し、その下限値の 30%および上限値の 300%」という考え方を導入することとした。その結果、本外部精度管理においては、良好範囲目標値を 300 ～15000 cfu/100ml として設定することとした。

## 7. 民間検査機関へのレジオネラ属菌検査研修

富山県内の水質検査登録機関および厚生センターと富山市保健所の細菌検査担当者を対象とし、案内文を発出した。また、近隣県の保健所、地衛研から参加希望があった。したがって参加者は、行政担当 9 機関 12 名(県外 3 機関 3 名を含む)と民間機関 9 機関 13 名、計 18 機関 25 名に対して研修を座学と実習の二部構成でおこなった。座学は富山県衛生研究所の講堂で、また、実習は細菌部の検査室でおこなった。スケジュールが過密であったため、遺伝子検査法は希望者だけを対象として午前中に行い、タカラバイオの EMA-qPCR 法と栄研化学の LAMP 法について、それぞれ 1 時間ずつの講義形式でおこなった。

午後からの講義は、レジオネラ症総論、開催県における環境・臨床材料からの分離状況、レジオネラ属菌検査法および他県における浴用水検査の実際とした。細菌部の検査室は所内規定により、バイオ

セーフティの講義を受講しなければ入室できないことから、短い時間ではあったが、参加者全員が受講した。

その後、検査室に移動し、①浴用水のろ過濃縮法と培養法、②斜光法の観察の二班に分かれ、それぞれ研修をおこなった。斜光法で観察する培養平板は当所に保管してあるレジオネラ属菌を、研修当日が培養3日目、7日目となるように作製した平板と、森本講師が浴用水にレジオネラ属菌を接種し、作製された模擬平板を用いた。最後に講堂に戻り、斜光法の復習として、スライド上でさまざまな菌の形態を確認した。

多く参加してもらうため、6月中に検査機関へ開催案内を発送した。参加希望者へは、開催直前に、研修内容と注意事項を記載した資料を送付した。また、実習時のグループ分けのため、事前アンケートも送付し、参加者の検査経験等の背景等を確認した。

講演依頼者から送付された資料を配布資料として準備した。

研修に実体顕微鏡を4台使用した。台数は多い方が良い。コールドライトは当所保有の2台を使用し、残る2台での観察にはペン式のLEDライト(LED LENSER)を用いた。

グローブ・マスクと同様、ディスポの予防衣を全員分準備した。また、入室時に履き替えが義務づけられているため、履物についても人数分準備した。

ろ過濃縮法では、浴用水にみため水道水500mlをフィルターろ過する過程を代表者が実施し、その後フィルターを15ml、50mlのチューブに入れて振り出し体験をした。また、100mlコルベンの中での振り出し法も見学した。ついで、酸、加熱処理をそれぞれがおこない、その一部の濃縮液を10分乾かした培地、30分乾かした培地の2枚にコンラージ棒で広げる方法を実施した。培地の乾燥具合によって、菌液の広がり、吸収具合など異なることを体験した。

斜光法の研修では培養平板のレジオネラ属菌特有といわれる「カットガラス」「モザイク模様」もしくは一部の菌に見られる「蛍光」などを観察した。純培養菌の培養3日目と7日目の平板上での相違、

また、実際の浴用水に菌を接種した模擬平板など、多くの平板を観察した。とりわけ、培養3日目でその特徴が顕著であること、レジオネラ属菌以外の菌が大きくなり、レジオネラ属菌が覆い隠される前に同定、釣菌できることから、偽陰性を減らすことができることを確認した。また、メーカーによっても発育状況や色など、多様であることも観察した。

#### 8. *L. pneumophila* の遺伝子型の解析

昨年度(2012年度)にレジオネラ・レファレンスセンターで収集した*L. pneumophila* 臨床分離株55株(さかのぼって収集された2010年分離の2株、2011年分離の4株以外は2012年~2013年に分離された)、およびそれ以前に収集された型別不能株であった*L. pneumophila* 臨床分離株10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。*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 cytidylyltransferase)をそれぞれコードする遺伝子である。

今までに収集された臨床分離株のうち、*neuA* 遺伝子が従来のプライマーで増幅できない菌株10株(血清群5が7株、血清群2、4、10が各1株)および昨年度収集分で*neuA* 遺伝子が従来のプライマーで増幅できなかった菌株2株(血清群5、10が各1株)については新しく提案された*neuAh* (*neuA* ホモログ)プライマーを用いて、遺伝子座を決定した。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。

#### 9. 地域差と感染源解明のための環境調査

河川水、土壌、車のウィンドウウォッシャー液、および公衆浴場のシャワー水を対象とした。河川水については、富山県の患者からのみ分離されている *L. pneumophila* serogroup 1 (SG1) の ST505 株が分離された浴用施設の近くを流れる西部地域の庄川を選んだ。そして、河川付近の土壌についても対象とした。また近年、車のウィンドウウォッシャー液はレジオネラ症との関連性が指摘され、また、浴場のシャワー水がレジオネラ症の感染源として報告されたことを受けて、対象とした。

試料は、平成 25 年 4 月～平成 25 年 10 月の 7 か月間、庄川に設定した 4 地点 (図 10) で採取した河川水 25 検体、土壌 20 検体である。また、車のウィンドウウォッシャー液については、協力機関 A、B で平成 25 年 10～11 月に採取した 41 検体である。シャワー水 32 検体については、約 30 秒間流出させた後、容器に採取した。

試料は、河川水 (1,000 ml) とシャワー水 (500 ml) は、メンブランフィルター (直径 47 mm, 0.22 μm, 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 100 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。ウィンドウウォッシャー液 (100 ml) はメンブランフィルター (直径 47 mm, 0.45 μm, ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE) を用い、50 倍濃縮量となる滅菌蒸留水を加えてボルテックスした。

河川水、ウィンドウウォッシャー液は濃縮検体 2 ml、土壌は約 50 g に滅菌蒸留水 100 ml を加えた試料に、アメーバ培養液 200 μl を添加後、35°C で 1 か月間培養した。培養液を酸処理液 (0.2M KCl-HCl, pH2.2) と等量混合後、室温で 15 分静置した。混合液 200 μl を GVPC 培地 (日研生物および極東製薬)、および MWY 培地 (OXOID) 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。

患者から分離される *L. pneumophila* 血清 1 との関連が報告されている lag-1 遺伝子の保有率を調べた。Kozak ら (J Clin Microbiol 2009 47:2525-2535) の報告したプライマー lag-F : 5'-CTCACAACAAGTCA

AGCAAC-3' および lag-R : 5'-AAACCATACCAAA GCAACAT-3' を用い、GoTaqHS (プロメガ) 10μl に lag-F、lag-R (2 μM) をそれぞれ 1 μl、テンプレート 2 μl を加え、20 μl になるよう H<sub>2</sub>O を加え反応液とした。PCR は 95°C 2 分、94°C 30 秒、57°C 30 秒、72°C 1 分を 30 サイクル、72°C 5 分で thermal cycler DICE (タカラバイオ) でおこなった。

#### 10. 家庭内環境における *Legionella* 汚染の実態に関する研究

9 軒の家庭において、平成 25 年 7 月 26 日から 10 月 8 日の期間に調査材料を採取した。試料は水試料およびスワブ試料とし、水試料は 25% チオ硫酸ナトリウム 2.0ml を添加した滅菌容器に原則として 1,000ml を採取した。水道水は放水直後に採取した。水試料は温度を採取時に、pH を実験室に搬送時に測定した。遊離残留塩素濃度は採取時に DPD 法により測定した。スワブ試料は、滅菌綿棒で採取部位を拭って採取し、リン酸緩衝液 (pH7.0) の 50 倍希釈液 1ml が入った滅菌管に入れた。各試料は冷蔵にて実験室に搬送し、検査まで冷蔵保存した。

アメーバによる *Legionella* 属菌の増殖では、水試料およびスワブ試料の再浮遊試料の加熱処理後の浮遊液 1.5ml を、無菌的に継代培養している *Acanthamoeba castellanii* を浮遊させた 50 倍希釈リン酸緩衝液に接種し、25°C で 3～5 日間培養した。培養後、培養液を pH2.2 緩衝液で 4 分間酸処理し、100μl ずつを GVPCα 寒天平板培地 (Oxoid) および WYOα 寒天平板培地 (栄研化学) に塗抹し、36°C で 7 日間培養した。

調査検体から分離された *Legionella* 様菌は、LEG (genus *Legionella* 16S rRNA gene) および Lmip (*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator gene) のプライマーを用いた PCR により *Legionella* 属菌であること *L. pneumophila* かどうかを決定した。さらに、型別用血清 (デンカ生研) および自発蛍光の有無により種の鑑別を行った。通常の方法により鑑別できない株は、16S rRNA あるいは mip 遺伝子のシーケンスにより種を決定した。

アメーバの分離は、水試料の原液および 50 倍濃縮液の 1.0ml をアメーバ分離用寒天平板に接種し、



25°Cで3日間培養した。プラークを計数するとともに、プラーク部分のアメーバを分離して鑑別を行った。得られたアメーバは栄養体やシストの形態あるいは鞭毛形成の有無、運動時や水中浮遊時などの形態観察から属を決定した。

調査の協力が得られた家庭の特性に関するアンケート調査を行った。アンケートの内容は、住居(形態、階数、築年数、居住人数)、水道(受水槽の有無、給湯装置、浄水器の有無)、浴槽(入浴頻度、浴槽水温度、給湯装置、清掃頻度、浴室の窓の有無、清浄剤の使用、配管の清掃、シャワーの使用、シャワーの清掃)、トイレ(温水洗浄便座の使用)、洗濯機(種類、使用年数、使用頻度、残り湯の使用、乾燥機能の使用、洗浄の頻度)とした。

#### 11. レジオネラ属菌遺伝子型とアメーバ適合性

*L. pneumophila* の遺伝子型に基づくグループとして亜種 *pneumophila* の C1 グループ(冷却塔水分離株)、亜種 *fraseri* の C2 グループ(冷却塔水、浴槽水および喀たん分離株)および S1 グループ(土壌、喀たん分離株)、さらに亜種 *pascullei* (シャワー、給水系分離株)を用いた。また *L. pneumophila* SG1 の対照株として2つの患者由来株を用いた。菌株は BCYEa 培地にて 30°C、3 日間培養し実験に供した。

浴槽水より分離した *Acanthamoeba* sp.、*Vannella* sp.、*Naegleria* sp. ならびに *Vexillifera* sp. を用いた。これらのアメーバ類は大腸菌塗布培地を用いて 30°C で培養し、栄養体を回収した。

培養した *L. p* 菌株をアメーバ用生理食塩水(AS)で希釈し濃度約 0.1 OD の菌液を調製した。加熱により不活化処理した大腸菌を用いて同様に菌液を調製し、2つの菌液を等量混合した。無栄養寒天培地に約 0.5ml の混合菌液を塗布し風乾させ試験培地とした。供試するアメーバについては増殖中の栄養体を培地上より回収し、AS で浮遊液を調製した。レジオネラ属菌を塗布した試験培地上に供試アメーバ浮遊液を滴下し風乾させ、アメーバと菌を接触させた。大腸菌のみを塗布した培地を用いて同様にアメーバ浮遊液を滴下し、これを対照実験とした。30°C で行い菌の感染を生きた栄養体の有無で評価した。評価に際してのスコアは以下のようにした。(+)は栄養体の増殖が認められ、また菌の細胞内増殖による破壊が認められない、菌の感染は成立しなかった状態。(±)は栄養体の増殖が認められるも、一部で菌の

感染があり細胞内増殖による破壊が認められる。(一)は菌の感染後細胞内増殖により破壊され、栄養体の増殖が認められない、死滅状態とした。

#### 12. 倫理面

本研究は、国立感染症研究所の病原体取扱管理規定にしたがい、周辺の環境の汚染を引き起こさず、個人情報保護に十分に配慮して行われた。

入浴施設における消毒剤としてモノクロラミンを使用するにあたり、関係者に周知した。

#### C. 研究結果および考察

##### 1. 温泉水におけるモノクロラミン濃度の安定性、配管洗浄

U温泉、S温泉、K温泉は pH8.5 以上のアルカリ性で、H温泉、Y温泉、N温泉と B温泉はアンモニウムイオンを含み、D温泉はヨウ素イオン、U温泉、K温泉は硫化水素を多く含む泉質である(表 1)。これら 8 種の源泉水と、入浴剤(硫黄の湯)を使った浴槽水、および井水と市水の計 11 種に対して、次亜塩素酸ナトリウムまたはモノクロラミン添加を行った。例示した H温泉の源泉水では、次亜塩素酸ナトリウム約 3 mg/L 添加時に急激な全残留塩素濃度の減少がみられたが(図 1-1)、モノクロラミン約 3 mg/L 添加時の全塩素濃度は安定して維持された(図 1-2)。なお、結果には示さないが、次亜塩素酸ナトリウム添加時の全残留塩素濃度と遊離塩素濃度は一致していた。温泉成分が類似した N温泉と Y温泉は、全残留塩素濃度の大幅な濃度減少、モノクロラミンの一定速度での減少がみられた。U温泉、D温泉、B温泉は、次亜塩素酸ナトリウムでもモノクロラミンでも、濃度が急減した。K温泉と S温泉は、いずれの添加時も濃度の減少はほとんどなかった。井水施設の井水(pH 7.3)は、次亜塩素酸ナトリウムでもモノクロラミンでも、濃度の減少はほとんどなかった(図 1-1、図 1-2)。

高濃度モノクロラミンによる配管の洗浄・消毒前後におけるろ過器の逆洗浄水の微生物検査結果を表 2(S温泉使用施設、全残留塩素濃度 21mg/L、一晚循環)に例示した。洗浄後に一般細菌数や従属栄養細菌数の大幅な減少が確認され、その洗浄・殺菌

効果が認められた。

井水施設のヘヤーキャッチャー接続配管内面を拭き取った検体の、従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数の変化と綿棒洗い出し液の写真を図 2 左に示した。同施設の対照浴槽の遊離塩素消毒（濃度約 1 mg/L）における拭き取り検体の、従属栄養細菌数、レジオネラ属菌数の変化と綿棒洗い出し液の写真を図 2 右に示した。

遊離塩素管理からモノクロラミン管理に切り替えた後の配管内面の従属栄養細菌数（青バー）は、大幅に減少（ $10^{-3}$  程度）し、レジオネラ属菌（赤バー）も検出されなくなった（図 2 左）。綿棒洗い出し液の濁りも減り、モノクロラミン管理時は濁りが少ない状態が継続した。一方、遊離塩素管理を継続した対照浴槽では、従属栄養細菌数と濁りに、モノクロラミンほどの変化はなかった（図 2 右）。モノクロラミン消毒は遊離塩素消毒よりも配管内面のバイオフィーム除去・殺菌効果が高いことが示された。

モノクロラミン添加時と遊離塩素添加時の経時的な濃度変化は、①モノクロラミン安定、遊離塩素急減、②モノクロラミン減少、遊離塩素急減、③遊離塩素、モノクロラミンいずれも急減の 3 タイプに大別された。このことから、①はモノクロラミンの利用が容易で、②はモノクロラミンの濃度維持が可能であれば消毒効果が期待でき、③は塩素消毒の適用の対象外と考えられた。

ろ過器および配管の消毒法として「循環式浴槽におけるレジオネラ症防止対策マニュアル（平成 13 年 9 月 11 日）」で規定する 10~50 mg/L の高濃度遊離塩素消毒を実施するためには大量の次亜塩素酸ナトリウムを投入する必要がある。ところが、浴槽水のモノクロラミン管理下の浴槽水中には多量のアンモニアが含まれ、高濃度遊離塩素消毒により、多量のトリクロラミンが発生する危険がある。一方、高濃度遊離塩素消毒の代わりに高濃度モノクロラミンによるろ過器および配管の洗浄消毒効果が確認・導入されれば、作業量、作業時間、費用等々の改善も含め、トリクロラミン発生は回避される。モノクロラミン消毒施設には、高濃度遊離塩素消毒の代替として、高濃度モノクロラミンによる洗浄を提

案したい。

各種イオンや温泉成分がモノクロラミン濃度に及ぼす影響を検証したところ、モノクロラミンへの影響がほとんど見られなかったのは、アンモニア態窒素（図 3）とフミン酸（図 4）であった。鉄イオンは、遊離塩素だけではなく、モノクロラミンへの影響が見られたが、添加直後の消失はモノクロラミンのほうが小さい傾向が見られたため、濃度管理を行う上ではモノクロラミンが有利と考えられた。ヨウ化物イオンは、遊離塩素のほうが消失の影響は小さいように見えたが、ヨウ化物イオンが DPD 法に影響を及ぼすことから正しい濃度を測定できていない可能性が示唆された。臭化物イオンは反応速度が遅かったが、ヨウ化物イオンと同様の傾向であった。換言すると、ヨウ化物イオンと臭化物イオンが存在する泉質では、正しい遊離塩素消毒と濃度測定ができていない恐れが考えられた。硫黄はいずれの消毒でも、添加直後に急速な塩素の消失が確認された。塩素の消費後は、濃度は安定した。以上の結果から、モノクロラミンに対しても影響を与える成分が存在することが確認できた。しかし、遊離塩素より反応の遅い泉質では、遊離塩素よりモノクロラミン濃度の維持がしやすいと考えられ、遊離塩素処理に苦慮する施設への適用を試みたいと考えている。

## 2. 消毒副生成物の暴露評価

小型のクローズド・ループ・ストリッピング (CLS) 装置を考案し、CLS-加熱脱離 (TD)-GC/MS および TD-GC/MS 法によるそれぞれ浴槽水中、浴室空気中のジハロメタン 6 化合物およびトリハロメタン 10 化合物の一斉分析方法を開発し、公衆浴場 2 施設で実態調査を行った（表 3）。さらに、塩素消毒/モノクロラミン消毒で生成することが予想されるハロ酢酸類についても LC/MS/MS による分析方法を開発し、浴槽水中にヨウ素化ハロ酢酸類が存在することを確認した（表 4）。その結果、モノクロラミン消毒は消毒副生成物の低減に概ね有効であるものの、ヨウ素イオンを含む源泉ではヨウ素化 THMs である  $\text{CHBr}_2$ 、 $\text{CHI}_3$  および  $\text{CHBr}_2\text{I}$  の生成量が顕著に増加すること、これらの THMs は気相中にも存在し、経気道暴露される可能性があることが明

らかになった。

### 3. 冷却水の消毒維持管理と菌の多様性

冷却水におけるレジオネラ属菌の検出実態を解析し、2001年から2012年にかけて、30%程度から25%弱に漸減しているが、殺菌剤処理をしていてもレジオネラ属菌が検出されること、殺菌剤の種類別検出率から塩素系殺菌剤はレジオネラ属菌を抑制できていないことが明らかになった(図5)。塩素剤処理の冷却水から検出されるレジオネラ属菌を調査した結果、無処理とは菌相が変化しており *L. pneumophila* SG1 や SG6 の割合が多くなっており、これらの菌種・血清群は塩素剤に対する抵抗性が高い可能性が示された。

また、冷却水中のレジオネラ属菌の菌種を、培養法と EMA-qPCR 法で調査した結果、冷却水には既存種に分類されないレジオネラ属の生菌が多く存在することが示された(表5)。このことは、培養法と EMA-qPCR 法の検査結果の一致程度を評価するうえで勘案すべきであることを示した。

塩素剤処理した冷却水に存在するレジオネラ属菌は、塩素剤に対する抵抗性が培地上で発育した菌よりも高くなっていることを実験室試験で確認した。このレジオネラ属菌の塩素抵抗性の要因を調査した結果、アメーバ内で増殖したレジオネラ属菌の塩素耐性が高いことが考えられた。

モデル冷却塔を用いて実際の冷却水と同様の運転条件を再現し、殺菌剤の種類別レジオネラ属菌抑制効果を20週間にわたり評価した結果、結合塩素剤の常時3mg/L維持はレジオネラ属菌が増殖し、菌数は無処理よりも高くなり有効性は認められなかった。遊離塩素を常時0.2mg/L以上維持した場合とイソチアゾリン製剤処理は、20週間にわたりレジオネラ属菌を抑制した。

今後、冷却水における有効なレジオネラ属菌の殺菌処理方法及び条件を確立することにより、冷却水に起因するレジオネラ症の発症数を抑制できることが期待される。

### 4. レジオネラ属菌迅速検査法の標準化 — 市販迅速検査キットの評価 —

レジオネラ属菌迅速検査法の標準化に向けた基礎的データを得るため、現在市販されている迅速検査キット(生菌と死菌の両方を検出する qPCR 法、LAMP 法)及び生菌迅速検査キット(生菌特異的検査法として新規に開発された LC EMA-qPCR 法)の3法について、浴槽水等の実試料を用い、平板培養法に対する感度、特異度等の評価を行った。

迅速検査キット：新規 qPCR キットと DNA 簡易熱抽出試薬を組み合わせた検出系を検討し、平板培養法10 CFU/100mlを検出するカットオフ値として、qPCR 法の5 CFU/100ml相当を用いることを提案した。このカットオフ値はROC曲線から求めた。qPCR 法と LAMP 法を使用した131件について平板培養法の結果と比較したところ、いずれも感度100%、特異度53.8%~57.0%と同等の成績を示し、迅速かつ簡便な操作でレジオネラ属菌汚染を評価できることを改めて明らかにした。死菌を検出して良ければ、簡便、迅速かつ高感度な検査法と言えた(表6(a)(b))。qPCR 法の平板培養法との相関は図6に示した。

生菌迅速検査キット：qPCR 法、LAMP 法、LC EMA-qPCR 法の3法を使用した131件では、LC EMA-qPCR 法を定性試験として評価した場合、平板培養法に対する感度は100%、特異度69.9%であったが、ROC解析により1CFU相当/100mLを陽性とする感度97.4%、特異度80.6%のように特異度に改善が認められた(表6(c)(d))。LC EMA-qPCR 法の平板培養法との相関は図7に示した。qPCR 法と LC EMA 法の ROC 曲線を比較したところ、各方法の AUC (Area Under the Curve) は、qPCR 法0.869に対して LC EMA 法0.949であり、LC EMA 法における診断能の高さが示された(図8)。また、検査法に若干の改良を加え、EMA 処理前に遠心により活性炭を除き、活性炭による DNA 吸着を防いで感度を上げる提案をした。消毒が義務付けられている循環式浴槽においては、生菌迅速検査キットは平板培養法の代替も可能と考えられた。今回の調査で、LC EMA 法が循環式浴槽で優れた成績が得られることが明らかとなったが、今後、塩素消毒が行われていない掛け流し式温泉等、LC EMA 法の適用範囲について検討を進めていく必要がある。

遺伝子を検出する迅速検査法は、培養法とは原理が異なることから完全な 1:1 対応はしないが、死菌を検出すること、生菌を検出することの各検査法の特徴を理解し、目的に応じて使い分ければ、培養法よりも迅速に結果を得ることが可能である。複数の迅速検査法を併用することも容易であり、多角的な評価を加えることで信頼性は高まると考えられた。

## 5. レジオネラ属菌検査法の安定化に向けた取り組み

レジオネラ属菌検査精度管理ワーキンググループでは、これまでの厚労科研研究事業において、レジオネラ属菌検査に係る外部精度管理について検討してきたところであるが、レジオネラ属菌の特異的な性質から、配付試料の作製について、その安定性と再現性及びそれらの妥当性評価において試行錯誤を繰り返してきた。精度管理を継続的に実施するためには、目的に合った配付試料を適切に作製する必要が不可欠であることから、昨年度の「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報告書」内では、『配付試料について、民間企業との協力も視野に入れ検討する必要がある』と報告していた。また、病原体の輸送においても日本国内での対応が平成 24 年 6 月以降厳しくなり、苦慮していたところである。

そこで本年度は、微生物定量試験用標準菌株の販売を行っているシスメックス・ビオメリュー社の BioBall を利用し、全国 39 の地方衛生研究所を対象に外部精度管理を試みた。その結果、配付試料の信頼性においてメーカー保証が得られ、また、メーカーによる商品発送対応であることから、多施設へ安定した輸送が可能となった。一方、外部精度管理報告結果では、検査機関ごとで大きなバラツキが認められた(表 7)。しかしながら、ワーキンググループが推奨する標準的な検査法で対応した場合には、適切な結果が得られた。表 8 では、その方法から非濃縮を省いたらどうなるか、さらに未処理(熱・酸処理をしない)を省いたらどうなるか、結果を示した。各検査機関での検査方法の違いが結果に大きく影響していることが示唆され、普段の検査結果においても同様に影響していることが懸念された。今後は、公衆

浴場の衛生管理要領で標準的な検査方法を提示し、全国共通の検査工程による体制作りが必要と考えられた。

## 6. 公衆浴場の衛生管理等に関する検討

衛生管理の基本は①微生物の繁殖及び生物膜等の生成の抑制、②設備内に定着する生物膜等の除去、③エアロゾルの飛散の抑制としている。これらに加えて、衛生管理の適正性を判断するために、年 1 回以上のレジオネラ検査が必要とされている。これまで入浴施設の衛生管理は厚生労働省の通知に基づいて実施され、レジオネラ症の発生を予防してきている。

厚生労働省は、入浴施設に関連したレジオネラ属菌感染症を防ぐために、通知等をもって旅館ならびに公衆浴場等における入浴施設の衛生管理の徹底を図っている。「建築物等におけるレジオネラ症防止対策について(平成 11 年 11 月 26 日付生衛発第 1679 号厚生省生活衛生局長通知)」、「公衆浴場における衛生等管理要領等について(平成 12 年 12 月 15 日生衛発第 1811 号厚生省生活衛生局長通知)」、「公衆浴場における衛生等管理要領等の改正について(平成 15 年 2 月 14 日付健発第 0214004 号厚生労働省健康局長通知)」、「レジオネラ症を予防するために必要な措置に関する技術上の指針(平成 15 年 7 月 25 日厚生労働省告示第 264 号)」等である。

一方、厚生労働研究費補助金事業の研究班では、入浴施設の衛生管理やレジオネラ属菌の検出法等に関する検討を重ね、多くの成果が得られている。

そこで、本研究班ではワーキンググループを立ち上げ、これまでに実施された研究の成果等を踏まえ、入浴施設の衛生管理やレジオネラ属菌の培養法等について、活用が期待される研究成果を整理した。検討した内容は、1) 消毒法、2) 検査法(迅速検査法、斜光法、検査法の標準化)、3) 洗浄効果の簡易判定法、4) レジオネラ属菌汚染の指標とした。1) にはモノクロラミン消毒、3) や 4) には ATP 測定等がある。

## 7. 民間検査機関へのレジオネラ属菌検査研修

富山県で、浴用水中のレジオネラ属菌の検査を行っている民間検査機関および地域の行政関係者

に対し、ろ過濃縮法および斜光法によるレジオネラ属菌同定法について研修会を開催した。

事前アンケートの結果、遺伝子検査に対する講習希望者が多かったため、EMA-qPCR法とLAMP法についても講義の時間を設けた。講義では、総論、浴用水調査の実例、および研究班で推奨する方法の説明などを聞いた。ろ過法・培養法の実習には、リストに示す器具・チューブ・可変式ピペットなどを準備したが、すべての器具を人数分準備するのは困難であった。観察標本として用意した *L. londiniensis* は菌の発育が遅く、余裕をもって培養を開始する必要があった。顕微鏡は4台準備したが、顕微鏡が不足して「時間が足りない」という感想が多く、今後の課題であると思われた。しかしながら、研修に対する参加者の評価はおおむね良好で、定期的な開催を望む意見が多かった。その一方で、この方法で実際の検査をおこなうにはコストがかかりすぎること、また、公定法が決まっていない現時点での検査法の取り入れ方など、検査の現場からの貴重な意見が寄せられた(表9)。

研修制度は必要であるが、どの方法で実施するのか、技術レベルをチェックする精度管理調査は誰がおこなうのかなど、制度とともに決めなければいけない課題が多くあることが明らかとなった。

#### 8. 新しい *neuAh* プライマーを利用した *Legionella pneumophila* 臨床分離株の SBT 法による遺伝子型別

レジオネラ症患者に由来する臨床分離株を収集して、SBT (sequence-based typing) 法を用いて遺伝子型別を行った。2012年度に収集された臨床分離株は55株(うち2株は同一の集団感染事例に由来する)で、血清群の内訳は血清群1が50株、血清群2、3、5、9、10が各1株だった。臨床分離株55株は41種類の遺伝子型に分けられ、そのうち新規遺伝子型は15種類だった。当初は散发事例と見られていた2事例の遺伝子型が一致したことから、2事例の関連性が確認できた。

*neuA* 遺伝子が従来のプライマーで増幅できない血清群1以外の株(血清群5が8株、血清群10が2株、血清群2、4が各1株)について、*neuAh* プライマーを用いたところすべて増幅でき、STを得るこ

とができた結果の一部を表10に示す。

#### 9. 富山県の不明感染源解明のための環境調査

富山県におけるレジオネラ症患者のおよそ4割は感染源が不明である。そこでこれまで調査してきた浴用水以外の感染源を特定するために、環境中に分布するレジオネラ属菌を調査した。今年度は対象として、河川水25検体、その周辺の土壌20検体に加えて、浴用施設のシャワー水32検体、車のウィンドウウォッシャー液(41検体)について、調査を実施した。その結果、河川水から7/25(28.0%、表11)、土壌から8/20(40.0%、表12)、シャワー水からは8/32(25.0%)、ウォッシャー液からは1/41(2.4%)のレジオネラ属菌が分離された。分離されたレジオネラ属菌は、河川水、土壌では *L. pneumophila* SG1 がもっとも多く、シャワー水ではSG1およびSG5が多かった。ウィンドウウォッシャー液から分離された1株は *L. rubrilucens* であった。富山県特有のST505の *L. pneumophila* SG1は河川水、土壌およびシャワー水から分離されなかった。しかしながら、これら環境から *L. pneumophila* SG1が多く分離され、また、ウォッシャー液からはヒトからの分離が報告されている *L. rubrilucens* が分離されるなど、さまざまな環境がレジオネラ症の感染源となりうることを示す結果となった。今後も水溜りやウォッシャー液のように、感染源となりうる環境を把握するため、更なる調査が必要である。

#### 10. 感染源不明クラスターに関連した環境、菌株調査

岡山県内で発生したレジオネラ症患者のうち、平成20年~25年に *L. pneumophila* (Lp) 血清群(SG)3を9株収集した(表13)。SBT法による型別の結果、すべての株がST93に型別され、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子パターンも一致した。このことは、患者の感染源及び原因菌が同一である可能性を示唆しており、感染源究明のための調査を継続実施している。現在までのところ、本菌は岡山県内のみで分離されており、地域特異的な菌株である。本年度は、浴槽水等140検体を検査し、31検体からレジオネラが分離された。また、保健所等が分離したレジオネラ菌株79株を収集した。これらのうちのLp SG3と、過去に浴

槽水等から分離された LpSG3 株を含め、131 株について PFGE 法による解析を行ったが、いずれの菌株も患者分離株とは遺伝子パターンが異なっており、感染源の究明には至らなかった。Lp SG3 の minimum spanning tree による解析でも、患者由来の ST93 株は環境由来株と clonal complex を作らず、類縁関係は見られなかった(図 11 左下の黄色の円)。今後も多様な検体について調査を行い、感染源を究明していく必要がある。

#### 11. 家庭内環境における *Legionella* 汚染の実態に関する研究

家庭内における *Legionella* 感染のリスクを把握し、感染予防対策作成の基礎資料とするために、家庭内の水環境から *Legionella* 属菌の分離を試みた。協力が得られた9軒の家庭から114検体(水試料63検体、スワブ試料46検体、その他5検体)を採取し、培養による *Legionella* 属菌の分離と LAMP 法による遺伝子の検出を行った。*Legionella* 属菌は水試料63検体中5検体(7.9%、表14)およびスワブ試料46検体中3検体(6.5%)から分離された。LAMP法では、水試料63検体中27検体(42.8%、表14)およびスワブ試料46検体中10検体(21.7%)から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された。菌を検出したあるいは LAMP 法が陽性であった検体は、給水・給湯水と蛇口、浴槽水、洗濯機内の水やドラム、トイレのロータンク、水槽水、庭の池やホースなどであった。検出された *Legionella* 属菌は *L. anisa*、*L. sainthelensi*、*L. busanensis* および *Legionella* sp. であった。今回の調査において、家庭環境が *Legionella* 属菌により汚染され、*Legionella* 感染リスクが存在することが明らかとなった。

#### 12. レジオネラ属遺伝子型とアメーバ適合性

*L. pneumophila* 分離株と自由生活性アメーバを用いて実験感染を行い、菌の遺伝子型グループとアメーバの適合性を調べた。*L. pneumophila* は冷却塔、土壌や臨床検体由来の C1、C2、S1 グループについて、アメーバは浴槽より分離した *Acanthamoeba* sp.、*Naegleria* sp.、*Vannella* sp. および *Vexillifera* sp. を試験した。*Acanthamoeba* はすべてのグループの菌が感染したが、*Naegleria* sp. および *Vannella* sp. は株により菌グループの感染性に違いを示し、菌の遺伝子型グループ(亜種

レベル)による宿主アメーバ適合性が異なることが示された(表 15)。例外的に標準株である Philadelphia 株(SG1)と C2 *fraseri* の標準株(SG5)が *Acanthamoeba* 感染性を示さなかったが、これは両者とも実験室内株として人工培養された期間が長く、アメーバ感染性に変異が生じたためではないかと予想される。

これらの結果は野外におけるレジオネラ属菌の分布、生態の決定要因に環境中のアメーバ相が関与していることを示唆するものであった。Lp の 3 亜種全てで増殖できる抵抗性のアメーバ、*pneumophila* で増殖できないアメーバ、*pneumophila* と *fraseri* で増殖できないアメーバ、*pascullei* を含め 3 亜種すべてで増殖できないアメーバ等の株がみられた。なお *Vexillifera* sp. はアメーバの中でもレジオネラ耐性的な性質を示し、野外環境において宿主とならないアメーバの存在の重要性を示唆した。

#### D. 結論

種々の成分を含む温泉源泉水にモノクロラミンと遊離塩素を添加して、それぞれの濃度安定性を調べることで、温泉水のモノクロラミン消毒の効果を事前に予測した。温泉に対するモノクロラミン消毒の適用の可否が事前にわかることで、モノクロラミン消毒の現場採用への理解が進むと思われる。ろ過器・配管の洗浄・殺菌方法として、約 20 mg/L の高濃度モノクロラミンによる洗浄・殺菌効果が示され、通常浴槽水のモノクロラミン消毒濃度による配管内のバイオフィーム除去効果が遊離塩素消毒よりも高いことが示された。循環式浴槽水へモノクロラミン消毒法を導入するのに必要な衛生管理手法は確立されたと考えられた。現場施設へのモノクロラミン消毒法の早急な導入・普及が望まれる。

本試験において検討した温泉成分 6 種中、モノクロラミンへの影響がほとんど見られなかったのはアンモニア態窒素とフミン酸の 2 成分であった。総鉄イオンについては、塩素剤の安定性に影響を及ぼす因子ではあるが、添加直後における消失は遊離塩素よりも少なく、濃度管理を行う上ではモノクロラミンのほうが適していると考えられた。硫黄については塩素剤への影響が強く、塩素剤での濃度管理を

行うのは非常に難しいと考えられた。臭化物イオンにおいてもモノクロラミンへの影響は確認されたが比較的小さいことから消毒管理法としては十分適用可能であると考え。モノクロラミンは、遊離塩素より濃度維持が有利な結果が得られており、遊離塩素処理に苦慮する施設への適用を試みたいと考えている。

小型クローズド・ループ・ストリッピング-加熱脱離-GC/MS による浴槽水中のジハロメタン及びトリハロメタン (DTHMs) の分析法、加熱脱離-GC/MS による浴室空气中 DTHMs 分析法、並びに LC/MS/MS による浴槽水中の HAAs の一斉分析法を開発・確立した。モノクロラミン消毒は消毒副生成物の低減化に概ね有効であるものの、ヨウ素イオンを含む源泉ではヨウ素化 DTHMs である  $\text{CHBr}_2$ 、 $\text{CHI}_3$  および  $\text{CHBr}_2\text{I}$  の生成量が顕著に増加すること、これらの DTHMs は気相中にも存在し経気道曝露される可能性があることが明らかになった。

2012 年の時点で、薬剤により水処理を行っているものも含めて、約 22% の冷却塔水からレジオネラ属菌が 10 CFU/100mL 以上検出されている。冷却水処理に使用する殺菌剤は、種類によりレジオネラ属菌抑制効果が異なり、検査結果の集計から塩素系殺菌剤はレジオネラ属菌の抑制に有効でないというデータとなっている。塩素剤処理の冷却水から検出されるレジオネラ属菌は、無処理に比べて菌相が変化している。冷却水には既存種に分類されないレジオネラ属菌の生菌が多く存在することが示唆され、培養法と EMA-qPCR 法の検査結果の一致程度を評価するうえで勘案すべきである。モデル冷却塔を用いて、実際の冷却水と同様の運転条件を再現し、殺菌剤の種類別レジオネラ属菌抑制効果を評価した結果、遊離塩素を常時 0.2mg/L 以上維持した場合とイソシアゾリン製剤処理は、試験開始後 20 週間にわたりレジオネラ属菌を抑制した。

レジオネラ属菌迅速検査法の標準化に向けた基礎的データを得るため、現在市販されている迅速検査法(生菌と死菌の両方を検出する qPCR 法、LAMP 法)及び生菌迅速検査法(LC EMA-qPCR 法)の 3 法について、浴槽水等の実試料を用い、平板培養法

に対する感度、特異度等の評価を行った。LC EMA-qPCR 法は、塩素消毒が行われている循環式浴槽を中心とした調査では、感度 100%、特異度 69.9% であったが、ROC 解析により 1CFU 相当/100mL を陽性とする感度 97.4%、特異度 80.6% のように特異度に改善が認められ、平板培養法と相関の高い定量値が得られたので検査法の代替も可能と考えられた。

微生物定量試験用標準菌株の販売を行っているシスメックス・ビオメリュー社の BioBall を利用し、全国 39 の地方衛生研究所を対象に外部精度管理を試みた。その結果、配付試料の信頼性においてメーカー保証が得られ、また、メーカーによる商品発送対応であることから、多施設へ安定した輸送が可能となった。ワーキンググループが推奨する標準的な検査法で対応した場合には、適切な結果が得られた。一方、各検査機関での検査方法の違いが結果に大きく影響していることが示唆された。今後は、公衆浴場の衛生管理要領で標準的な検査方法を提示し、全国共通の検査工程による体制作りが必要と考えられた。

民間検査機関に向へのレジオネラ属菌検査研修を富山と久留米の 2 ヶ所で行なった。実体顕微鏡でレジオネラの特徴であるカットグラス用のコロニーの外観を把握した。また長波紫外線による青白色の自発蛍光を把握した。参加者から、とても良かった、是非この観察法である斜光法を取り入れたいとの回答が多かった。

*L. pneumophila* 臨床床分離株 55 株について遺伝子型別を行った。別々の自治体から届けられた 2 株は同時期に同一の公衆浴場を利用しており、同じ ST (新規 ST) で、集団感染事例の可能性が示唆された。55 株は 41 種類の ST に分けられ、SBT 法の疫学的有用性が確認できた。15 種類は新規 ST だった。また *neuAh* プライマーが導入されたことによりほとんどの分離株の遺伝子型別が可能となった。今後も分離株の遺伝子型を調べ、分離株の動向を明らかにしていく必要がある。

富山県では、*L. pneumophila* SG1 の ST505 が西部の庄川付近の患者および浴用施設から複数分離さ

れている。そこで今年度は、庄川および庄川付近の土壌から ST505 が分離されるのかを明らかにするため、河川水および土壌の調査をおこなったが、ST505 は検出されなかった。しかしながら、*L. pneumophila* SG1 をはじめとする *Legionella* 属菌が複数の河川水および土壌から分離された。さらに、臨床分離株の大半が保有している *lag-I* 遺伝子を保有している株も土壌から検出された。河川水および土壌がレジオネラ症の感染源となる可能性が示唆された。

今まで岡山県で収集した患者由来 Lp SG3 株はすべて ST93 で、PFGE 法による遺伝子パターンも一致していた。Lp SG3 の 131 株(患者及び浴槽水等環境由来株)について、遺伝子解析(PFGE 法、一部の株については SBT 法及び minimum spanning tree)を行った。Lp SG3 は、患者由来株と環境由来株では、PFGE による遺伝子パターンが異なっており、ST による minimum spanning tree 解析でも、関連は見られなかった。

9 軒の家庭の給水・給湯水、蛇口、浴槽水、トイレ、洗濯機、水槽、ホース等から 114 検体を採取し、*Legionella* 属菌が 8 検体 (7.0%) から検出され、LAMP 法により 37 検体 (32.5%) から *Legionella* 属菌の遺伝子が検出された。*Legionella* 属菌やその遺伝子が検出されたのは、給水・給湯水と蛇口、浴槽水、洗濯機内の水やドラム、トイレのロータンク、水槽水、庭の池やホースであった。これらの検体は従属栄養細菌数も高く、*Legionella* 属菌の増殖が可能な環境であることが推測された。今後さらに調査を進め、家庭環境における *Legionella* 属菌の汚染状況を把握して、感染予防のために *Legionella* 感染リスクを明確にする必要がある。

*L. pneumophila* と環境中のアメーバの感染実験結果から、菌の遺伝子型グループにより宿主アメーバに対する適合性が異なることが示された。この結果は野外におけるレジオネラ属菌の分布、生態の決定要因に環境中のアメーバ相が関与していることを示唆するものであった。レジオネラ属菌に対する抑制因子としてのアメーバの存在が指摘され、その重要性を今後明らかにする必要があることも示唆された。

E. 健康危険情報  
なし。

F. 研究発表

1. 論文・総説発表

- 1) Kanatani JI, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, and Watahiki M: Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group of clinical isolates in Toyama prefecture, Japan. *J. Infect. Chemother.* 19(4):644-52, 2013.
- 2) Kanatani JI, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, and Watahiki M: Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads by sequence-based typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(13):3959-3966, 2013.
- 3) Furuhashi K, Okuno R, Kawano K, Isobe J, Fukuyama M: Pulsed-field gel electrophoresis pattern analysis and antibiotic susceptibility of *Legionella londiniensis* isolated from hot spring water samples in Japan. *J. Environ. Dis.* 22: 13-19, 2013.
- 4) Nishizuka M, Suzuki H, Ara T, Watanabe M, Morita M, Sato C, Tsuchida F, Seto J, Amemura-Maekawa J, Kura F, Takeda H: A case of pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 12 and treated successfully with imipenem, *J. Infect. Chemother.* in press.
- 5) 佐原啓二、神田隆、八木美弥、道越勇樹、杉山寛治、縣邦雄、江口大介、市村祐二、久保田明、富田敦子、片山富士男、神野透人、小坂浩司、泉山信司、八木田健司、倉文明：浴槽水のモノクロラミン消毒、病原微生物検出情報、Vol. 34 No. 6, 14-15 (2013)
- 6) 中嶋 洋, 大島律子, 河合央博, 前川純子, 倉文明, 藤井寛之, 黒川幸徳, 船橋圭輔, 田中知徳, 吉岡明彦, 宮井泰三: 患者由来 *Legionella pneumophila* 血清群 3 sequence type 93 の疫学



- 調査一岡山県．病原微生物検出情報 34(6):164-5, 2013.
- 7) 前川純子、倉 文明、大西 真、渡辺ユウ、渡辺祐子、磯部順子、田中 忍、中嶋 洋、吉野修司：レジオネラ臨床分離株の型別-レファレンスセンター活動報告として、病原微生物検出情報 34(6):161-3, 2013.
  - 8) 金谷潤一、磯部順子、木全恵子、嶋 智子、清水美和子、佐多徹太郎、綿引正則、前川純子、倉 文明：水たまりからのレジオネラ検出状況-富山県、病原微生物検出情報 34(6):163-4, 2013.
  - 9) 烏谷竜哉、荒井桂子、磯部順子、金谷潤一、緒方喜久代、泉山信司、八木田健司、矢崎知子、吉崎美和、倉 文明：レジオネラ生菌の迅速検査、病原微生物検出情報 34(6):165-7, 2013.
  - 10) 黒木俊郎、渡辺祐子、寺西 大、佐々木美江、藤田雅弘、荒井桂子、杉山寛治、磯部順子、中嶋 洋、田栗利紹、緒方喜久代、倉 文明：ATP測定による入浴施設の衛生管理・レジオネラ汚染リスク評価、病原微生物検出情報 34(6):167-8, 2013.
  - 11) 倉 文明、前川純子：レジオネラ症-最近の多様な感染源、病原微生物検出情報 34(6):169-70, 2013.
  - 12) 杉山寛治：浴槽水のモノクロラミン消毒による衛生管理、公益財団法人中央温泉研究所第53回温泉保護・管理研修会テキスト, 13-1～13-4 (2013)
  - 13) 中臣昌広著、倉 文明監修：レジオネラ症対策のてびき、一般財団法人日本環境衛生センター、2013年10月25日第1版発行。
  - 14) 三橋 徹、五十嵐 悠、大幡 保夫、川田 葉子、鈴木 かおる、小野 嘉之、古藤 絵美、小寺 由美、加藤 愛矢、牛頭 文雄、渡辺 昭嘉、荒井桂子：太陽熱温水器で加温された給湯水によるレジオネラ症感染事例について、生活と環境 58巻12号 62-64 (2013)
  - 15) 井上浩章、高間朋子、石間智生、縣邦雄：各種水利用設備のレジオネラ属菌検出実態、防菌防黴誌. Vol. 41, NO. 12, pp659-661 (2013)
2. 学会発表
- 1) Amemura-Maekawa J, Koyano M, Yamazaki T, Murai M, Ohnishi M, Kura F: Identification of *Legionella pneumophila* subspecies in clinical and environmental isolates in Japan using the microplate DNA-DNA hybridization method. The 8<sup>th</sup> International Conference on Legionella 2013. Melbourne. October 2013.
  - 2) Kura F, Amemura-Maekawa J, Ohnishi M, Saito T, Kinoshita H, Yoshikura H, Sunagawa T, Ohishi K: Epidemiology of legionellosis in Japan, Jan 2008 ~ Dec 2012. The 8<sup>th</sup> International Conference on Legionella 2013. Melbourne. October 2013.
  - 3) Kanatani JI, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Amemura-Maekawa J, Kura F, Sata T, Watahiki M: Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads by sequence-based typing. The 8<sup>th</sup> International Conference on Legionella 2013. Melbourne. October 2013.
  - 4) Sahara K, Sugiyama K, Agata K, Eguchi D, Ichimura Y, Jinno H, Kosaka K, Izumiyama S, Yagita K, Katayama F, Tomita A, Michikoshi Y, Yagi M, Tanaka Y, Endo T, Kura F: Sanitary control of circulating bath water by Monochloramine disinfection. The 8<sup>th</sup> International Conference on Legionella 2013. Melbourne. October 2013.
  - 5) 金谷潤一、磯部順子、木全恵子、嶋 智子、清水美和子、倉 文明、佐多徹太郎、綿引正則：アスファルト道路の水たまり由来 *Legionella pneumophila* 血清群1群の遺伝子解析. 第87回日本感染症学会学術講演会、2013年6月、横浜.
  - 6) 前川純子、倉 文明、多田有希、渡辺ユウ、渡辺祐子、磯部順子、田中 忍、中嶋 洋、吉野

修司、大西 真、レジオネラ・ワーキンググループ *Legionella pneumophila* 臨床分離株の遺伝子解析による分類. 第 87 回日本感染症学会学術講演会、2013 年 6 月、横浜.

- 7) 前川純子、倉 文明、渡辺ユウ、渡辺祐子、磯部順子、田中 忍、中嶋 洋、吉野修司、大西真、レジオネラ・ワーキンググループ *Legionella pneumophila* 血清群 1 環境分離株の遺伝子解析による分類. 第 87 回日本感染症学会学術講演会、2013 年 6 月、横浜.
- 8) 井上浩章、小野寺順子、石間智生、縣邦雄：冷却水のレジオネラ属菌に対する NaClO の殺菌効果調査、日本防菌防黴学会第 40 回年次大会、大阪 (2013)
- 9) 佐原啓二、杉山寛治、縣邦雄、江口大介、市村祐二、神野透人、小坂浩司、泉山信司、八木田健司、片山富士男、富田敦子、道越勇樹、八木美弥、田中慶郎、遠藤卓郎、倉文明：モノクロラミンによる循環式浴槽の消毒効果について—営業施設における検証試験—、日本防菌防黴学会第 40 回年次大会、大阪 (2013)
- 10) 鳥谷竜哉、泉山信司、吉崎美和、荒井桂子、磯部順子、緒方喜久代、金谷潤一、矢崎知子、八木田健司、倉文明、液体培養 (Liquid Culture) EMA-qPCR 法を用いたレジオネラ生菌迅速検査法の評価、日本防菌防黴学会第 40 回年次大会、2013 年 9 月、豊中市
- 11) 井上浩章、藤村玲子、縣 邦雄、太田寛行：エチジウムモノアジド処理 PCR 法による環境水中のレジオネラ属菌の検出、第 29 回日本微生物生態学会、鹿児島 (2013. 6)
- 12) 倉 文明：レジオネラ症に関する最新の知見、地研全国協議会関東甲信静支部平成 25 年度細菌研究部会総会・研究会、招請講演、2014 年 2 月、東京都.
- 13) 田原麻衣子、香川(田中)聡子、岡元陽子、杉山寛治、五十嵐良明、倉 文明、神野透人：LC/MS/MS を用いた直接分析法による水中のハロ酢酸類の定量. 日本薬学会第 134 年会 (2014.3, 熊本)

### 3. 研修会

- 1) 杉山寛治：モノクロラミン消毒法の活用、第 23 回レジオネラ対策シンポジウム、NPO 入浴施設衛生管理推進協議会主催、2013 年 6 月 12 日、東京
- 2) 緒方喜久代、森本 洋、磯部順子、倉 文明：レジオネラ症総論、環境・臨床材料からのレジオネラ属菌の分離培養法について、レジオネラ属の培養法のコツと注意点；実習 ろ過濃縮・プレート処理、顕微鏡観察、九州地区レジオネラ実技研修会、関東化学主催、2013 年 8 月 23 日、久留米
- 3) 磯部順子、金谷潤一、緒方喜久代、森本 洋、倉 文明：レジオネラ症総論、富山県における環境・臨床材料からの分離状況、培養法概論と斜光法について、大分県における浴槽水検査の実際；実習 ろ過法・培養法・顕微鏡観察、レジオネラ検査研修会、富山県衛生研究所主催、2013 年 9 月 27 日、富山
- 4) 磯部順子、神野透人、渡辺祐子、中臣昌広、倉 文明：民間検査機関に向けたレジオネラ属菌培養検査法の研修、モノクロラミン消毒による消毒副生成物の低減について、家庭内におけるレジオネラ検出状況、ホテル給湯系のレジオネラ属菌検出時の対応事例 (文京区)、国際的なレジオネラ対策の動向、平成 25 年度生活衛生関係技術担当者研修会、2014 年 3 月 5 日、東京
- 5) 森本 洋、倉 文明：レジオネラ症総論、レジオネラ症を予防するために、レジオネラ属菌培養法、斜光法を利用したレジオネラ属菌培養法実習、「レジオネラと環境衛生」研修会、福岡市保健環境研究所主催、2014 年 3 月 13-14 日、福岡市

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1 モノクロラミン濃度安定性を調べた8ヶ所の温泉の成分表

温泉名	H温泉	U温泉	S温泉	K温泉	Y温泉	N温泉	D温泉	B温泉
泉質	ナトリウム・カルシウム-塩化物泉	単純硫黄温泉	ナトリウム-炭酸水素塩温泉	アルカリ性単純硫黄温泉	ナトリウム・カルシウム-塩化物泉	ナトリウム・カルシウム-塩化物泉	ナトリウム-塩化物泉	ナトリウム-炭酸水素塩温泉
	低張性	低張性	低張性	低張性	高張性	高張性	高張性	低張性
pH	8.2	9.6	9.0	10.2	7.36	8.37	8.1	8.4
温度	26.3	38.2	29.5	31.4	31.0	20.9	33.7	20.4
Na+	341.2	65.8	311.9	68.1	2926	1849	3515	480
K+	15	1.0	4.6	1.4	17.8	9.4	96.3	20.5
NH4+	0.4				2.9	1.4		7.5
Mg++	23	1.5		0.1	4.2	3.8	43.8	7.1
Ca++	101		1.2	6.7	2224	2576	120.9	7.6
Sr++					32.2	12.3		0.06
Ba++					0.5	0.2		
Mn++	0.3				0.3	0.7	0.08	0.04
Al+++				0.07			0.03	0.15
Fe++					0.8		1.2	0.86
Fe+++						0.5		
F-					0.9	0.7		
HCO3-	78.2	29.1	703.0	11.5	16.7		1101	1170
CO3--		44.0	57.7	72.9				22.8
OH-	0.027	0.7	0.2	2.7			0.021	
Cl-	701.5	4.9	3.4		7854.0	7024.0	5158	88
Br-	0.8		0.5	0.06	24.8	21.1	8.2	
I-			0.4		1.5	1.6	12.6	
HS-		12.5	0.4	3.8	0.1	0.2		
SO4--	62.6	15.2	1.8	6.0				0.1
BO2-		3.6					42.3	2.7
S2O3--		11.4				0.3		
HSiO3-	23.4			69.7			114.3	62.8
メタケイ酸		58.1	24.4		11.1	0.6		
メタホウ酸	0.8		10.8		20.1	11.9		

単位: mg/kg

表2 高濃度モノクロラミン洗浄前後のろ過器逆洗浄水の微生物検査 (S温泉)

10月20日 17:30 T-Cl2=3.6mg/L	ATP(pmol/L)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養細菌数 (CFU/mL)	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	アメーバ数 (PFU/100mL)	種類
1分	1700	34000	530000	<10	8	VK
2分	2100	64000	900000	<10	10	VK
3分	1900	96000	640000	<10	6	VK
4分	1700	63000	>1000000	<10	2	VK
5分	1600	860000	620000	<10	4	VK
6分	1400	120000	>1000000	<10	2	VK
7分	310	30000	32000	<10	<2	
10月21日 8:40 T-Cl2=21mg/L	ATP(pmol/L)	一般細菌数 (CFU/mL)	従属栄養細菌数 (CFU/mL)	レジオネラ属菌数 (CFU/100mL)	アメーバ数 (PFU/100mL)	種類
1分	61	120	130	<10	<2	
2分	28	90	81	<10	<2	
3分	30	57	84	<10	<2	
4分	17	57	69	<10	<2	
5分	16	95	72	<10	<2	
6分	16	86	110	<10	<2	
7分	23	500	500	<10	<2	

10月20日18:00のモノクロラミンを高濃度添加(計算値20mg/L)し、一晚循環した。翌朝(10月21日)は、全残留塩素濃度は21mg/Lであった。

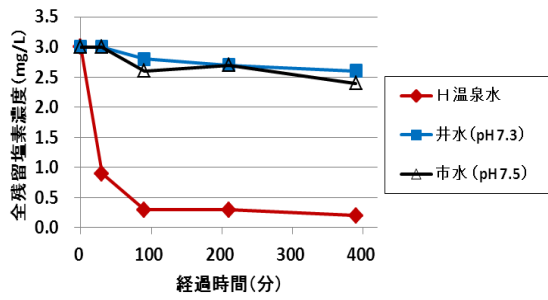


図 1-1 温泉源泉水へ次亜塩素酸ナトリウム添加時の全残留塩素濃度の経時変化

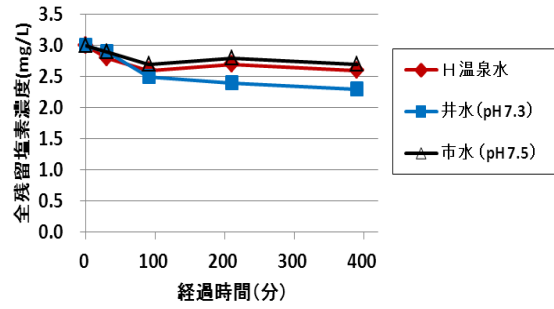


図 1-2 H温泉源泉水へモノクロロミン添加時の全残留塩素濃度の経時変化

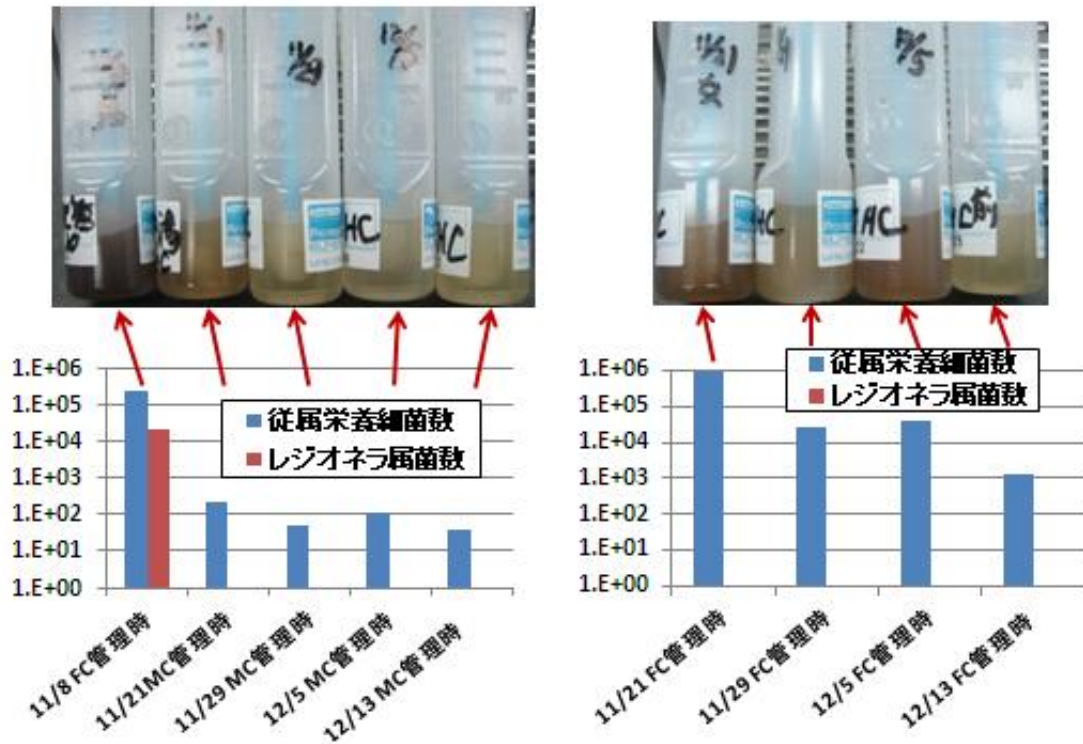
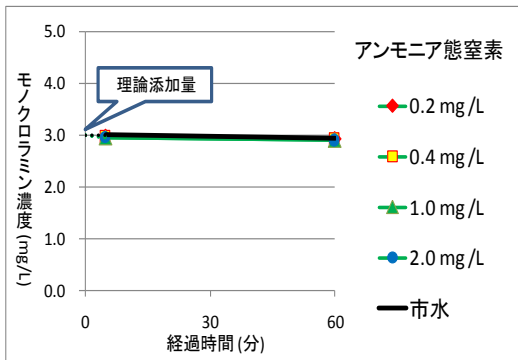
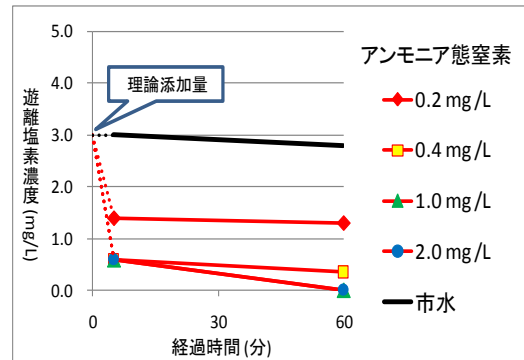


図 2 通常濃度のモノクロロミン (MC, 3mg/L) と遊離塩素 (FC, 1mg/L) 消毒時の配管内面の拭き取りの一綿棒当たりの菌数と綿棒洗い出し液の濁り・色の比較

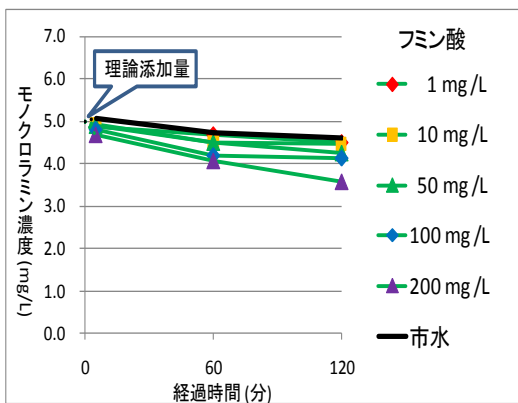


(1) モノクロラミン

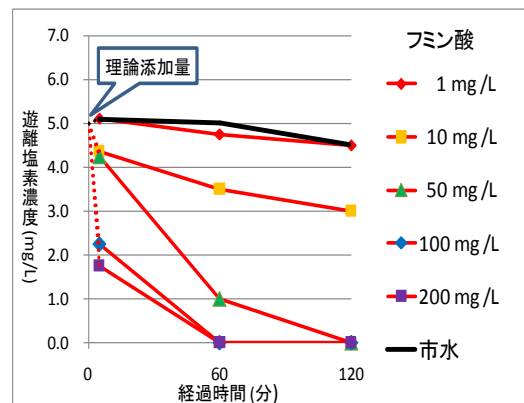


(2) 遊離塩素

図3 アンモニア態窒素 0.2~2.0 mg/L が与える塩素剤への影響



(1) モノクロラミン



(2) 遊離塩素

図4 フミン酸 1~200 mg/L が与える塩素剤への影響

表3 試験的にモノクロラミン消毒を導入した施設Hの浴槽水中および浴室空气中DTHMs濃度

DTHMs	塩素消毒浴槽・浴室		モノクロラミン消毒浴槽・浴室		
	浴槽水 (μg/L)	浴室空気 (μg/m <sup>3</sup> )	浴槽水 (μg/L)	浴室空気 (μg/m <sup>3</sup> )	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.14	ND	ND	ND	
CH <sub>2</sub> BrCl	ND	ND	ND	ND	
CH <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	ND	ND	ND	ND	
CH <sub>2</sub> ClI	ND	ND	ND	ND	
CH <sub>2</sub> BrI	ND	ND	ND	ND	
CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	ND	ND	ND	ND	
CHCl <sub>3</sub>	9.78	16.00	0.26	1.58	
CHBrCl <sub>2</sub>	8.33	12.08	0.14	0.58	
CHBr <sub>2</sub> Cl	7.41	8.35	0.23	0.60	
CHCl <sub>2</sub> I	0.10	0.45	ND	0.09	
CHBr <sub>3</sub>	2.66	2.47	0.65	1.19	
CHBrClI	ND	0.09	0.18	0.04	
CHBr <sub>2</sub> I	ND	0.06	ND	0.08	
CHClI <sub>2</sub>	ND	0.64	ND	0.05	
CHBrI <sub>2</sub>	ND	ND	ND	ND	
CHI <sub>3</sub>	ND	0.77	ND	0.61	
Total DHMs	0.14	ND	ND	ND	
Total THMs	28.27	40.91	1.45	4.81	

表4 試験的にモノクロラミン消毒を導入した施設HおよびYの浴槽水中HAAs濃度

HAAs	HAAs濃度 (μg/L)			
	施設H		施設Y	
	塩素	モノクロラミン	塩素	モノクロラミン
MCAA	12.3	2.5	ND	ND
DCAA	28.0	ND	7.3	8.1
TCAA	5.0	ND	ND	ND
MBAA	2.8	ND	2.0	ND
DBAA	3.6	1.7	24.4	ND
BCAA	8.9	ND	2.3	ND
BDCAA	ND	ND	ND	ND
DBCAA	ND	ND	ND	ND
MIAA	1.3	1.4	ND	ND
DIAA	ND	ND	ND	1.8
CIAA	ND	ND	ND	ND
BIAA	ND	ND	ND	1.6
Total HAAs	61.9	5.6	36.0	11.5

表5 培養法及びEMA-qPCR法による冷却水からのレジオネラ属菌検出結果

Sample	Plate culture		EMA-qPCR		
	<i>Legionella</i> counts (CFU/100ml)	Identification of <i>Legionella</i> species (%)	<i>Legionella</i> DNA (pg/liter) (A)	<i>L. pneumophila</i> DNA (pg/liter) (B)	% <i>L. pneumophila</i> (B/A×100)
ctw A	$1.2 \times 10^3$	<i>L. pneumophila</i> (100)	60	7.5	13
ctw B	$2.9 \times 10^2$	<i>L. pneumophila</i> (97), <i>Legionella</i> sp. L-29 (3)	4600	140	3
ctw C	$7.6 \times 10^4$	<i>L. pneumophila</i> (100)	9000	700	8

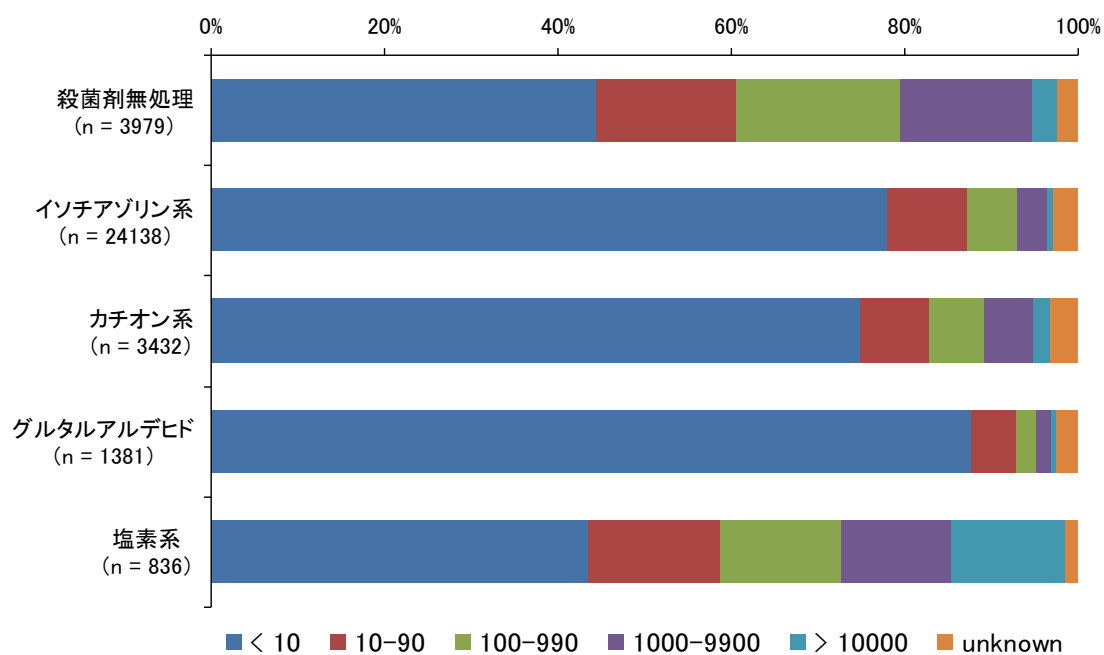


図5 殺菌剤の種類別レジオネラ属菌の菌数分布  
(凡例は、レジオネラ属菌数の範囲を示す 単位：CFU/100mL)

表 6 qPCR、LAMP、LC EMA-qPCR 3 法実施 131 検体における感度、特異度の比較

(a) qPCR 法陽性：5 CFU/100ml 以上（再掲）

		CFU/100ml)		
		平板培養法		
		≥ 10	< 10	
qPCR	≥ 5	38	43	81
	< 5	0	50	50
		38	93	131
感度	100%	陽性的中率		46.9%
特異度	53.8%	陰性的中率		100%

(b) LAMP 法陽性：レジオネラ遺伝子検出

		CFU/100ml)		
		平板培養法		
		≥ 10	< 10	
LAMP	検出	38	40	78
	不検出	0	53	53
		38	93	131
感度	100%	陽性的中率		48.7%
特異度	57.0%	陰性的中率		100%

(c) LC EMA 法陽性：レジオネラ遺伝子検出

		CFU/100ml)		
		平板培養法		
		≥ 10	< 10	
LC EMA	検出	38	28	66
qPCR	不検出	0	65	65
		38	93	131
感度	100%	陽性的中率		57.6%
特異度	69.9%	陰性的中率		100%

(d) LC EMA 法陽性：1 CFU/100ml 以上

		CFU/100ml)		
		平板培養法		
		≥ 10	< 10	
LC EMA	≥ 1	37	18	55
qPCR	< 1	1	75	76
		38	93	131
感度	97.4%	陽性的中率		67.3%
特異度	80.6%	陰性的中率		98.7%



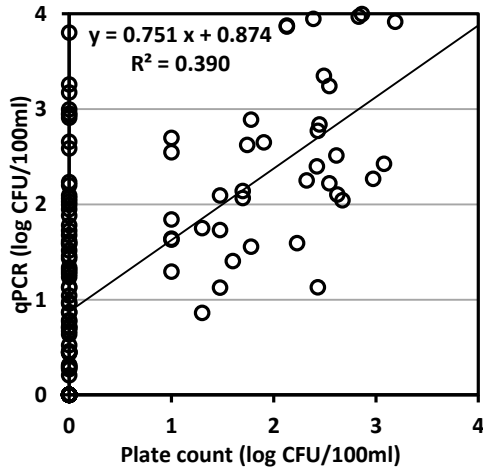


図6 平板培養法とqPCR法の相関 (n=131)

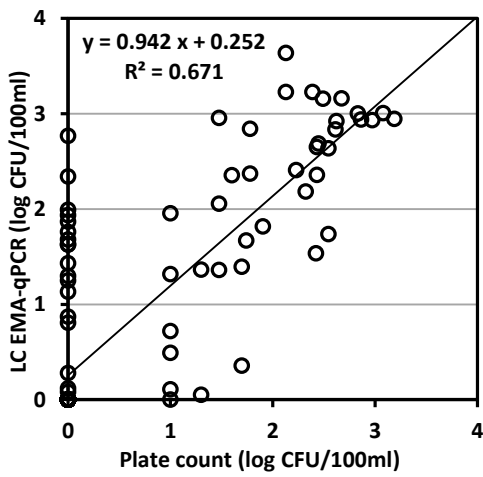


図7 平板培養法とLC EMA法の相関 (n=131)

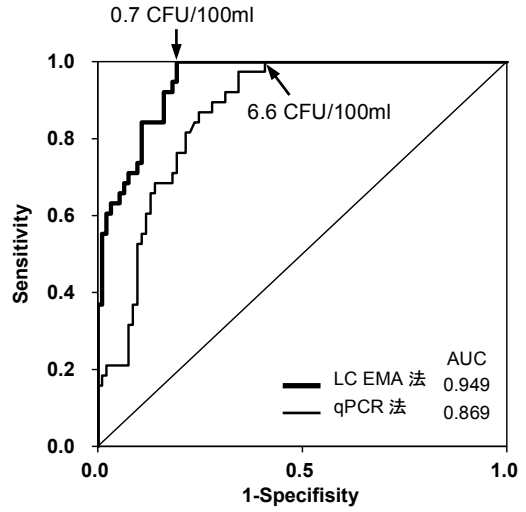


図8 qPCR法とLC EMA法のROC曲線 (n=131)

表 7-1 各参加機関検査作業書による判定結果（全 39 機関のべ 42 試料）

参加機関	最終判定結果 cfu/100ml	濃縮処理			前処理				使用培地				
		非濃縮	ろ過法	遠心法	未	酸	熱	熱+酸	BCYE α	WYO α	GVPC	MWY	BMPA α
1	2000	◎	○		◎	◎	○		◎(未・酸)		◎(未)	◎(未・酸)	
	5000	◎	○		◎	◎	○		◎(未・酸)		○	○	
2	3000	◎	○		◎	○	○		◎	○	○	○	
3	110	○	◎		○	◎	○			○	○	◎	
4	2000	○	◎		◎	○	○		◎		○		
5	60			◎	◎	○	○				◎		
6	20			◎		◎	○				◎		
7	20		◎			◎				○	◎	○	
8	56	○	◎		○	◎			○	◎(合算)	◎(合算)		
9	160	○	◎		○	◎	○				◎		
10	220		◎			◎	○				◎		
11	400	○	◎		○	◎				◎			
12	10	○	◎			◎					◎		
13	30		◎			◎				◎			
14	40		◎				◎				◎		
15	350	○	◎		○	◎	○		○	○	◎	○	
16	310	○		◎	○	◎	○		◎		○		
17	300		◎				◎		○	◎			
18	80		◎				◎			◎(同数)	◎(同数)		
19	80		◎		○		◎	○			◎		
20	50	○	◎		○	◎					◎		
21	15		◎				◎				◎	◎	
22	200	○	◎		◎	○	○		◎		○		

表 7-2 各参加機関検査作業書による判定結果（全 39 機関のべ 42 試料）

参加機関	最終判定結果 cfu/100ml	濃縮処理			前処理				使用培地				
		非濃縮	ろ過法	遠心法	未	酸	熱	熱+酸	BCYE α	WYO α	GVPC	MWY	BMPA α
23	160	○		◎	○	◎	○				◎		
24	20	○	◎		○	◎	○				◎		
25	920	○	◎		◎	○					◎		
26	530	○	◎		◎	○	○		○	◎			
27	120	○	◎		○	◎	○		○	○	◎		
	190	○	◎		○	◎	○		○	◎	○		
	30	○	◎		○	◎	○		○	○	◎		
28	40		◎		◎	○	○				◎		
29	25			◎		◎					◎		
30	30		◎		○	◎	○		○	○	○		◎
31	10		◎		○	◎	○			◎			
32	20		◎		○	◎				○	◎		
33	70		◎			◎	○			◎	○		
34	850	○	◎		◎	○	○	○	◎		○		
35	110			◎			◎			◎	○		
36	3000	○	◎		◎		○		○		◎		
37	810		◎		◎	○	○		◎			○	
38	370	○	◎		◎	○						◎	
39	560	○	◎		◎	○	○		◎		○		

平均値 532.7619048

最大値 5000

最小値 10

中央値 115

表 8 WG 法による結果（各条件による最大値）

参加機関	試料	結果 (cfu/100ml)						
		① 全条件	② ①-BCYE	③ 一非濃縮	④ ③-未処理	⑤ ④で酸処理	⑥ ④で熱処理	⑧ 各作業書
A	1	3000	<b>2000</b>	<b>740</b>	410	410	160	3000
	2	2000	<b>2000</b>	<b>760</b>	320	320	80	2000
B	3	3000	<b>1000</b>	<b>840</b>	270	200	270	3000
	4	2000	<b>2000</b>	<b>200</b>	110	110	90	110
C	5	5000	<b>1000</b>	<b>300</b>	160	160	110	160
	6	4000	<b>4000</b>	<b>920</b>	520	520	440	1970
E	7	6000	<b>4000</b>	<b>740</b>	300	300	190	56 (異なる試料)
	8	1000	<b>1000</b>	<b>510</b>	160	160	80	160
	9	2000	<b>2000</b>	<b>150</b>	120	120	<10	80
	10	1000	<b>1000</b>	<b>200</b>	140	140	<10	80
	11	210	<b>210</b>	<b>210</b>	170	170	<10	170
	G	12	1500	<b>1000</b>	<b>300</b>	250	120	250
	13	1500	<b>1500</b>	<b>740</b>	350	350	280	350
	H	14	2500	<b>2500</b>	<b>180</b>	50	50	50
I	15	5000	<b>1000</b>	<b>170</b>	120	120	80	120
	16	8000	<b>220</b>	<b>220</b>	190	190	40	190
	17	10000	<b>1000</b>	<b>180</b>	30	30	<10	30
	J	18	2500	<b>1500</b>	<b>720</b>	595	595	390
K	19	4300	<b>2700</b>	<b>430</b>	140	100	140	560
19試料		18/19(95%)	<b>17/19(89%)</b>	<b>11/19(58%)</b>	6/19(32%)	6/19(32%)	2/19(11%)	7/19(37%)
平均		3395.26316	<b>1664.736842</b>	<b>447.8947368</b>	231.8421053	219.210526	139.473684	850
最大		10000	<b>4000</b>	<b>920</b>	595	595	440	3000
最小		210	<b>210</b>	<b>150</b>	30	30	<10	30
中央値		2500	<b>1500</b>	<b>300</b>	170	160	90	180

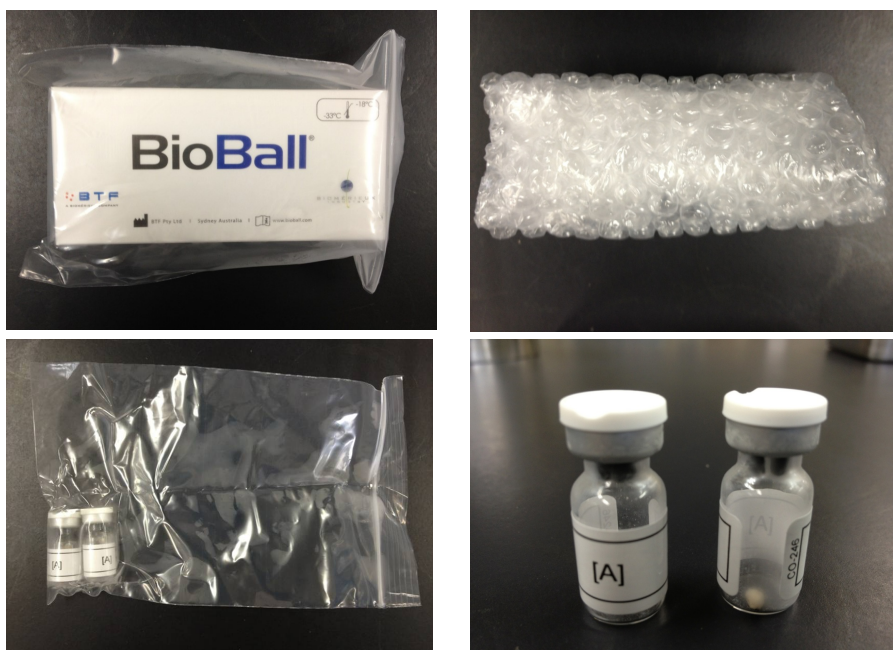


図 9 外部精度管理配布試料

表9 事後アンケートの結果（複数回答あり）

1 ① 催時期は適当であったか？		2 講義内容	
適当	24	① 他に聞きたい内容は？	
10月か11月での開催を希望する	1	参考になった	2
未回答	1	モノクロラミン消毒法について	2
②開催場所と人数は適当であったか？		公定法はいつ提示されるのか？	1
場所：適当	24	公定法までの推奨法を知りたい	1
：交通不便	1	② ろ過濃縮法	
：狭い	1	適当	4
人数：適当	21	器具など手元が不便であった	5
：半分くらいを希望	2	時間が短い	5
：多すぎる	3	通して実施してみたかった	3
③スケジュールは適当か？		ろ過法を初めて実施した	1
適当	14	③ 斜光法	
タイト	8	人数が多すぎる・顕微鏡が少ない	2
講義の途中で休憩がほしい	3	時間が短い	2
1日での研修にしてほしい	3	とても良かった。	11
		ぜひ取り入れたい	3
3 遺伝子検査法の研修に対する意見		4 その他	
適当	3	定期的開催を望む	3
デモンストレーションしてほしかった	1	コスト高が予想され、実施は困難	1
資料の文字が小さい	1	精度管理調査を希望する	1

表10 *neuAh* プライマーを用いたこれまで型別不能だった臨床分離株の型別結果

(*neuAh* プライマーを用いた場合の遺伝子座番号は200番台となる。)

NIBB 番号	分離 年	性 別	感染源	種名	血清 群	ST (Sequence Type)	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuAh</i>	同じSTの報告があるか
0088	1986	女	不明	<i>L. pneumophila</i>	4	1377	2	14	16	25	7	13	206	国外1例
0092	1986	女	不明	<i>L. pneumophila</i>	5	1424	23	12	31	6	48	31	220	国内
0098	1987	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	5	1424	23	12	31	6	48	31	220	国内
0100	1988	女	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	2	1354	2	10	24	28	4	4	207	国外2例(環境)
0390	2003	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	5	1531	10	22	7	6	14	8	220	無
2137	2001	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	5	1427	3	12	1	6	14	9	220	国内
2299	2007	男	入浴施設	<i>L. pneumophila</i>	5	1427	3	12	1	6	14	9	220	国内
2304	2002	男	温泉(推定)	<i>L. pneumophila</i>	5	1424	23	12	31	6	48	31	220	国内
2651	2010	男	不明(旅行)	<i>L. pneumophila</i>	10	1425	3	4	1	28	14	9	207	無
2682	2010	男	不明	<i>L. pneumophila</i>	5	1413	8	6	34	9	53	8	209	国外2例(環境)

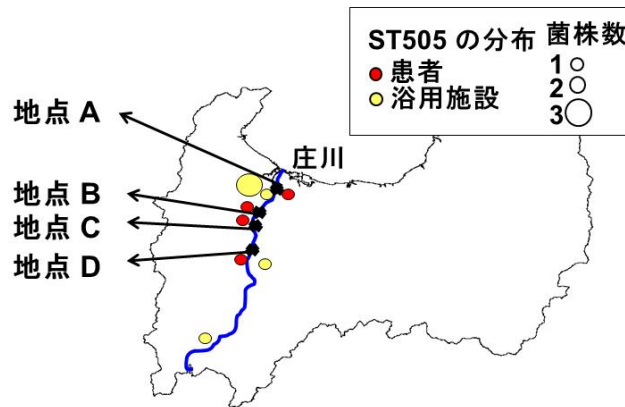


図 10 河川水および土壌調査地点と ST505 分離状況

表 11 河川水のレジオネラ属菌検出結果\*

月	地点			
	A	B	C	D
4	ND	ND**	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND
6	ND	SG1, SG3, SG6	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND
9	SG1	SG6	ND	<i>L. spp.</i>
10	SG1, SG3, SG6	SG3	ND	SG1

\*ND ; 不検出. 血清群を示した菌株は *mip* 遺伝子陽性で *L. pneumophila* と確認した.

\*\*2 検体採取

表 12 土壌のレジオネラ属菌検出結果\*

月	地点			
	A	B	C	D
5	ND	SG1, SG6, <i>L. spp.</i>	ND	ND
6	SG1, <i>L. spp.</i>	ND	ND	ND
7	<i>L. spp.</i>	SG1	ND	SG1, SG8
9	SG1, SG8	ND	ND	ND
10	SG3	<i>L. spp.</i>	ND	ND

\*ND ; 不検出. 血清群を示した菌株は *mip* 遺伝子陽性で *L. pneumophila* と確認した.

表 13 県内で発生したレジオネラ症患者分離株 (平成 19 年～25 年)

菌株No	分離年	血清群	ST	PFGE パターン	住所地	年齢	性別	検体	症状					その他	
									発熱	咳嗽	呼吸困難	意識障害	肺炎		
K 9	2007	1	595		倉敷市	64	男	喀痰	●	●	●	●	●		
K 11	2007	1	593		新見市	69	男	喀痰	●		●	●	●		
K 105	2008	1	609		倉敷市	59	男	喀痰	●		●	●	●	頭痛	
K 117	2008	1	609		倉敷市	79	男	喀痰	●		●	●	●		
K 118	2008	1	594		新見市	55	男	喀痰	●	●		●	●		
K 090729	2009	1	550		総社市	37	男	喀痰	●	●		●	●	下痢	
O 100216	2009	1	23		不明	54	男	喀痰	●		●		●		
K 100118	2010	1	609		総社市	58	男	喀痰	●				●		
K 100503	2010	1	42		倉敷市	69	男	喀痰	●			●	●		
K 110728	2011	1	1077		倉敷市	55	女	喀痰	●		●		●	胸部異常影 糖尿病あり	
K 111019	2011	1	120		倉敷市	78	男	喀痰	●		●		●		
KD 111109	2011	1	120		倉敷市	78	男	喀痰			●	●	●	腹痛、多臓器不全	
K 111117	2011	1	1077		倉敷市	91	男	喀痰	●	●			●		
K 111213	2011	1	1077		倉敷市	69	男	喀痰	●	●		●	●		
K 120214	2012	1	42		岡山市	55	男	喀痰	●		●		●		
K 121108	2012	1	530		倉敷市	71	男	喀痰			●		●	ICUに入院	
KD 110625	2011	2	354		広島市	63	男	喀痰	●	●			●	肺炎から死亡 糖尿病あり	
K 79	2008	3	93	一致	倉敷市	66	男	喀痰	●	●			●		
K 86	2008	3	93		笠岡市	58	女	喀痰						●	胸部異常影、症状無し
K 95	2008	3	93		倉敷市	79	男	喀痰						●	胸部異常影、症状無し
K 100423	2010	3	93		岡山市	60	女	肺胞洗浄液	●		●			●	
K 100712	2010	3	93		倉敷市	74	男	喀痰	●					●	
K 110707	2011	3	93		総社市	77	男	喀痰							胸部異常影、症状無し
K 110908	2011	3	93		倉敷市	59	女	喀痰							胸部異常影、症状無し
K 120831	2012	3	93		広島県	58	女	喀痰							胸部異常影、非定型肺炎疑い
K 130920	2013	3	93		不明	73	男	喀痰	●	●					
K 130108	2013	9	1283			倉敷市	65	男	喀痰	●				●	全身倦怠感
KD 120905	2012	10	新分離株			真庭市	74	男	喀痰	●	●	●		●	ICUに入院

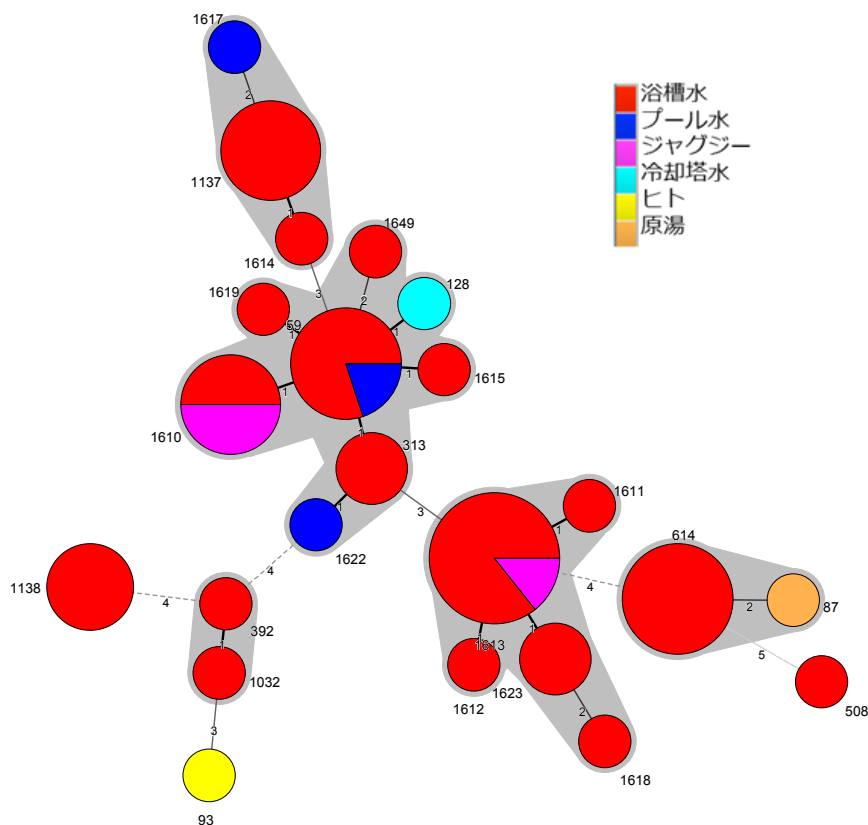


図 11 *Legionella pneumophila* SG3 の SBT 法による minimum spanning tree

円の大きさは菌株数を示す。円の中の数字は ST を示す。

短く太い線は、single locus variant。 薄い実線は、double locus variant。

背景が太い集まりは clonal complex を示し、隣り合う遺伝子座の違いが 2 つ以下の ST の集団を示す。

線の間数字は、7 つの locus の内いくつ違うかを示す。

表 14 家庭環境で採取した水試料の性状と *Legionella* 属菌の汚染状況

試料	家庭数	検体数	温度 (°C)		pH		塩素濃度 (ppm)		HPC (CFU/ml)		培養 陽性 (CFU/ml)	LAMP 陽性	アเมอร์バ増菌後 培養陽性 LAMP 陽性	
			平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲	平均 <sup>a</sup>	範囲				
台所 蛇口水	4	6	29.3	23.5-42.0	7.6	7.2-7.8	0.63	0.5-0.8	189	0-932	0	1	0	0
風呂 蛇口水	4	5	29.8	24.5-42.0	7.5	7.2-7.8	0.47	0-0.8	145	1-484	0	0	0	0
風呂 給湯水	4	7	34.4	26.5-39.0	7.5	7.1-7.8	0.20	0-0.8	5,726	13-32,800	0	1	0	0
風呂 浴槽水	3	4	34.5	26.5-42.0	7.5	7.3-7.7	0	0	187,765	1,060-465,000	1 <sup>b</sup>	3	0	0
風呂 シャワーホース内水	1	2	25.0	25.0	7.2	7.2	0	0	465,000	465,000	0	1	0	0
洗面台 蛇口水	3	4	26.0	25.5-26.5	7.4	7.2-7.8	0.47	0-0.8	16,897	6-46,000	1 <sup>c</sup>	2	0	0
トイレ ボタン内水	4	5	24.6	24.1-25.0	7.4	7.1-7.6	0.27	0.1-0.4	1,128	87-1,820	0	1	0	2
水洗便座ツケ水	1	2	29.0	29.0	7.5	7.5	0	0	1,666	82-3,250	0	0	0	0
洗濯機内水	3	4	25.6	24.7-26.5	7.6	7.5-7.6	0.10	0-0.2	21,790	2,220-50,000	0	3	0	1
庭 蛇口水	1	2	24.8	24.8	7.4	7.4	0.6	0.6	0	0	0	0	0	0
庭 ホース内水	2	3	25.2	25.0-25.4	7.4	7.3-7.6	0.1	0-0.2	300,045	90-600,000	1 <sup>d</sup>	0	0	0
庭 散水器	1	2	30.8	29.3-32.3	7.0	6.7-7.2	0	0	26,800	26,800	0	0	0	0
庭 雨水マス	1	1	24.0	24.0	7.4	7.4	0	0	—	—	0	0	0	0
庭 池	1	3	23.8	23.6-24.0	4.3	3.8-4.8	0	0	—	—	0	1	0	2
水槽	5	12	27.1	22.0-34.0	7.1	5.4-8.1	0	0	—	—	2 <sup>e</sup>	5	0	4
公園 蛇口水	—	1	26.5	26.5	7.3	7.3	0	0	—	—	0	0	0	0
合計	—	63									5	18	0	9

a: 幾何平均、 b: *Legionella anisa* 検出、 c: *Legionella* sp. L-29 検出、 d: *Legionella busanensis* 検出、 e: *Legionella anisa* および *L. sainthelensi* 検出

表 15 遺伝型グループ(亜種レベル) 分類に基づく *L. pneumonia* 菌株とアメーバ感染の関係

菌株	ソース	ST	血清型	グループ	Subssp.	AC1	AC2	NG1	NG2	NG3	NG4	NG5	NG6	NG7	VN1	VN2	VN3	VN4	VN5	VX1
Lp080-045	患者		SG1		pneumo.	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	+	+
1	患者	36	SG1		pneumo.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1052	冷却塔	1	OLDA	C1	pneumo.?	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	+	±	—	+	+
1592	冷却塔	1	Oxford	C1	pneumo.?	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	±	+	+	+	+
5	冷却塔		SG5	C2	fraseri	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
590	冷却塔	154	Oxford	C2	fraseri	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
595	冷却塔	150	Oxford	C2	fraseri	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
694	冷却塔	598	Oxford	C2	fraseri	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1269	冷却塔	607	Oxford	C2	fraseri	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2501	喀痰	595	SG1	C2	fraseri	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2514	喀痰	608	SG1	C2	fraseri	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
2709	冷却塔	986	SG1	C2	fraseri	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2907	浴槽	1290	SG1	C2	fraseri	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2343	土壌	741	Philadel.	S1?	fraseri	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2564	喀痰	701	SG1	S1?	fraseri	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2752	喀痰	1023	SG1	S1?	fraseri	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
150	シャワー		SG5		pascullei	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2781	給水系		SG5		pascullei	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.coli (対照)						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

AC: *Acanthamoeba* sp.

NG: *Naegleria* sp.

VN: *Vannella* sp.

VX: *Vexillifera* sp.

+: アメーバ増殖を示す (レジオネラ非感染性)

—: アメーバ死滅を示す (レジオネラ感染性)

±: 栄養体の増殖が認められるも、一部で菌の感染があり細胞内増殖による破壊が認められる。



