

図1 水試料からのレジオネラ属菌検査法の検査過程

表1 想定されるレジオネラ属菌検査法マニュアルの内容

水試料等からのレジオネラ属菌検出法

目次

I. 概要	3 前処理
II. 始める前に	1) 試薬
III. 検査室の設備	2) 器具及び器材
IV. 操作に必要な技術等	3) 操作
V. 検査実施操作	4 培養
1 試料の採取	1) 試薬
1) 試薬	2) 器具及び器材
2) 器具及び器材	3) 操作
3) 試料の種類	5 平板の観察、釣菌
4) 操作	1) 試薬
5) 試料の搬送と保存	2) 器具及び器材
2 試料の濃縮	3) 操作
2.1 メンブレンフィルターろ過法	6 レジオネラ属菌の鑑別、確定
1) 試薬	1) 試薬
2) 器具及び器材	2) 器具及び器材
3) 操作	3) 操作
2.2 遠心沈殿法	VI 精度管理
1) 試薬	VII 機器の管理
2) 器具及び器材	VIII Q&A
3) 操作	

表2 使いやすいマニュアルを想定した形式の1例

3) 試料の種類

レジオネラ属菌検査の対象となる水試料には、浴槽水、冷却塔水、水道水、給湯水、その他の水試料がある。

4) 操作

浴槽等で採水する場合は、容器を水に沈めることを避けるために、滅菌した柄杓等を用いて〇〇mlの容器に採水する。注1

採水時に温度等、現場で測定可能な項目を測定する。

注1

標準法として〇〇濃縮を推奨しており、基本試験量は〇〇mlとしているが、予備の検水確保のために倍量である〇〇mLとした。もし〇〇濃縮を行う場合は、基本試験量の倍量を確保することが奨められる。

ワンポイント

容器の外側がレジオネラ属菌に汚染されていることが想定される場合は、搬入後、容器外側を消毒してから検査を行う。

5) 試料の搬送と保存

試料は〇～〇℃で搬送する。注2 検査開始までは、採取後〇～〇日以内が望ましいとされているが、可能な限り速やかに行う。濃縮検体の保存は〇日を超えてはならない。保存温度は〇±〇℃が望ましい。

注2

宅配便等の冷蔵システム利用の場合はそれに従う。検査室への速やかな搬入が可能な場合は常温も可。

ワンポイント

試料への酸素供給を配慮して、採水時に容器を満杯にせず、上部に空間を残すようにする

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)
「レジオネラ検査の標準化及び消毒に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」

平成 27 年度分担研究報告書

レジオネラ属菌の培養検査法と精度管理

研究分担者 佐々木麻里 大分県衛生環境研究センター
研究協力者 一ノ瀬和也、百武兼道 大分県衛生環境研究センター
研究協力者 緒方喜久代 公益社団法人大分県薬剤師会検査センター
研究協力者 森中りえか、原口浩幸 株式会社ファスマック

研究要旨： 標準的な検査法を提示する一助として、迅速培養法(斜光法を取り入れた培養法)と従来法、遺伝子検査法(LAMP 法及び比色系パルサー法)について検討を行った。培養検査に斜光法を取り入れることにより、より短い期間で正確な培養結果が得られた。従来法との比較においては同等の結果が得られたが、遺伝子検査法の比較においては、培養(+)遺伝子検査(-)の不一致が認められ、検査法として導入するにあたり、その原因を明らかにする必要がある。LAMP 法についてはレジオネラ属菌の菌数、比色系パルサー法については泉質などの要因が考えられた。

精度管理手法に関する検討を行った。(森本ワーキンググループ)

A. 研究目的

浴槽水のレジオネラ属菌の検査法として広く用いられている培養法は結果を得るまでに 7 日から 10 日の長い時間を要する。患者発生時の原因施設特定などの緊急調査時やレジオネラ属菌汚染施設の清掃・殺菌後の安全確認調査など、浴槽水中のレジオネラ属菌の存在あるいは菌数を速やかに把握する必要がある場合は、監視現場からより迅速で、かつ正確な検査が求められている。そこで、様々な泉質を有する温泉水等を対象に、正確・簡便・迅速な培養結果を得る方法としての斜光法(分離培地上の出現コロニーに 2 方向から斜光をあて、実体顕微鏡下で観察をするとレジオネラ属菌は特徴的なモザイク状の形態を示すことを利用した方法:参考文献¹⁾をレジオネラ属菌検査の標準法に導入することを目的に従来の培養法との比較検討を行った。

一方、迅速に結果が得られることから

LAMP 法の活用に期待が寄せられているが、様々な泉質を有する温泉水等を利用した公衆浴場においては、培養(+)LAMP(-)の不一致の結果が得られることが多々あり、その原因の解決が課題となっている。培養法と遺伝子検査法(とくに LAMP 法)の不一致検体について、その原因を明らかにするため、栄研化学株式会社と共同で検討を行なった。

さらに、簡易迅速検査法の一つとして、比色系パルサー法(Fig.1)について検討した。

また、精度管理手法に関する検討を行った。

B. 研究方法

1. 材料および検査法

平成 27 年 8 月から 10 月に搬入された浴槽水および湯口水、25 施設 50 検体を対象とした。

検査法は新版レジオネラ症防止指針に準じて実施した。すなわち、検水 1200ml をメンブランフィルター（直径 47mm、 ϕ 0.2 μ m、ADVANTEC 社 POLYCARBONATE）で吸引ろ過し、ろ過後のフィルターを滅菌蒸留水 12ml 入りの滅菌コニカルビーカー（100ml 容量）に移し、ボルテックスミキサーにて 1 分間洗い出しをした。ろ過濃縮後、濃縮検体（未加熱と表記）と 50°C 20 分加熱後、急冷した濃縮検体（加熱処理と表記）をそれぞれ濃縮試料（100 倍濃縮）とした。

2. 培養法

レジオネラ属菌の分離培地として WYO α 寒天平板（栄研化学）、GVPC 寒天平板（日研生物）、MWY 寒天平板（自家製；Oxoid）を用い、非濃縮処理の検水および各濃縮試料について、必要に応じて階段希釈し、その 200 μ L を各分離平板 1 枚にコンラージ棒で塗布し、これらの培地を乾燥しないようにビニール袋に入れ、輪ゴム止めをした後、36°C で培養した。本法における検出感度は 5cfu/100mL である。

培養 3 日目に、2 方向から光を照射し、実体顕微鏡下で各分離培地を観察した。レジオネラ属菌が疑われたコロニーは、BCYE α 寒天培地（自家製）及び血液寒天培地（ウマ血、自家製）に接種し、血液寒天培地での発育の有無を確認すると同時に、PCR 法での同定検査を行った。斜光法観察後の分離培地は 36°C で 10 日間培養を継続し、分離平板上に出現した灰白色のレジオネラ様コロニーについて、同様の同定検査を行った。最終的に同定されたコロニー数をもって検水 100ml あたりのレジオネラ属菌数に換算した。分離した菌株は、Legionella Latex Test Kit (OXOID) 及びレジオネラ免疫血清（デンカ生研）を用いたスライド凝集反応により血清群型別を行った。

また、SG1 が確認された株については Lag1 の保有の有無について、PCR 法にて確認を実施した。

3. LAMP 法

濃縮検体について、Legionella Detection Kit E（栄研化学）を用い、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA320-C で 1 検体につき

3 回繰り返し測定を行った。

4. 比色系パルサー法

（方法①）濃縮検体 18 検体について、1ml を 12,000rpm (13,000 \times g) で 5 分遠心後、上清を全て除いたものを冷蔵送付し、2 日後に株式会社ファスマックにおいて溶菌液を調製して測定を実施した。

（方法②）濃縮検体 32 検体について、次の方法で調製した溶菌液を冷凍送付したものをを用いて、株式会社ファスマックにおいて測定を実施した。溶菌液は、濃縮検体 1ml を 12,000rpm (13,000 \times g) で 10 分遠心後、70 μ l 残して上清を除去し、30 μ l の変性液を加えて、37°C 15 分溶菌し、その後 10 μ l の中和液を加えて調製した。

方法①、方法②とも濃縮検体 1 検体につき 2 回溶菌液を調製して測定を行った（方法①の 1 検体は 1 回のみ）。

5. 精度管理手法に関する検討

森本研究分担者の報告参照。

C. 研究結果

1. 培養法

培養結果の概要を Table 1 に示した。50 検体中 25 検体（50%）からレジオネラ属菌が検出された。内訳は「掛け流し施設」では浴槽水 14 検体中 7 検体（50%）、湯口水 14 検体中 6 検体（43%）で、「循環式施設」では浴槽水 11 検体中 6 検体（55%）、湯口水 11 検体中 6 検体（55%）であった。

浴槽水と湯口水ともにレジオネラ属菌が検出された施設は 10 施設であった。浴槽水（+）湯口水（-）となった施設は 3 施設、浴槽水（-）湯口水（+）となった施設は 2 施設であった（Table 2）。

レジオネラ属菌が検出された 25 検体について分離培地の検出感度を比較した結果を Table 3 に示した。濃縮未加熱検体では、使用した 3 種類の分離培地全てから分離されたものが 17 検体、WYO α +MWY からの分離が 2 検体、GVPC+MWY からの分離が 1 検体、GVPC のみからの分離、MWY のみからの分離が各々 1 検体であった。濃縮加熱検体では、3 種類の分離培地全てから分離されたものが 20 検体、WYO α +MWY からの分離が 1 検体、WYO α のみからの分離が 1 検体、GVPC のみからの分離が 2 検体であった。

斜光法は培養 3 日目を判定日とし、特徴あ

るモザイク状のコロニーについて確認検査を行った。その結果、レジオネラ属菌が検出された25検体のうち23検体は斜光法で確認することができたが、2検体は継続培養後にレジオネラ属菌が確認された。2検体から分離されたレジオネラ属菌は、いずれも *L. pneumophila* が1株(5cfu/100mlに相当)であった。

検出菌の血清群別の結果を Table 4 に示した。SG1 株が6検体から検出されたが、いずれも Lag1 遺伝子を保有している株はなかった。

2. LAMP 法

濃縮検体1検体につき3回繰り返し測定を行い、1回でも陽性となった場合は、その結果を採用した(Table 5)。2検体が培養(+)LAMP(-)の不一致の結果となった。2検体のレジオネラ属菌数は40cfu/100mL、50cfu/100mLであり、それぞれ3菌種(*L. pneumophila*、*L. quinlivanii*、及び*L. rubrilucens*)と1菌種(*L. pneumophilla*)が検出された。

培養結果との不一致の原因について、栄研化学の協力を得ながら検討を行なった結果、泉質による阻害は見られなかった。

3. 比色系パルサー法

濃縮検体1検体につき2回測定を行い、1回でも陽性となった場合は、その結果を採用した。

方法①について、18検体中培養法で(+)となった8検体のうち、半数以上の5検体がパルサー(-)となった(Table 6-1)。その培養菌数は50cfu/100mlから1500cfu/100mlであった。

方法②について実施した結果、32検体中、培養法、パルサー法ともに(+)となったのは13検体、培養法(-)パルサー(+)となったのは5検体、培養(+)パルサー(-)の不一致の結果となったのは4検体であった(Table 6-2)。不一致の結果となった4検体は、2施設から採取した浴槽水及び湯口水各2検体であり、40cfu/100mlから50cfu/100mlのレジオネラ属菌が検出された。その4検体につい

て、非濃縮検体を用いてろ過したフィルターから直接溶菌する方法で測定したところ、1施設2検体についてはパルサー(+)となったが、もう1施設2検体についてはパルサー(-)であった。後者の2検体から分離されたレジオネラ属菌は、*L. pneumophila*、*L. quinlivanii*、及び*L. rubrilucens*であり、分離された全ての株において、比色系パルサー法のプローブと100%マッチしていることを確認した。

D. 考察

斜光法は高価かつ特殊な機器を必要とせず、簡便で迅速な結果が得られる培養法として、非常に有用な方法である。培養7日以降で発育を認める検体もあったため、培養3日目で培養検査を打ち切ることはできないものの、培養にかかる日数の短縮、検査精度向上の観点からも導入に向けた研修を行うことは意義がある。今後は、LAMP法で得られた結果と斜光法の培養結果を合わせて迅速な行政対応を行い、10日間引き続き培養を継続し、最終結果として判断することが可能と考える。3日目観察・同定後、最終判定日の10日目まで作業を中断することができることから、負担軽減にも功を奏し、また、検査を集中することにより検出確率が上昇する利点も考えられた。

レジオネラ属菌が検出された25検体について、使用した分離培地 WYOα、GVPC、MWY の個々で分離状況をみると、各分離培地でのレジオネラ属菌の分離は19検体から22検体であり、レジオネラ属菌を感度よく分離するためには、レジオネラ属菌の発育特性に配慮し、選択性の異なる培地を併用することが望ましい。また、未加熱の濃縮検体では22検体から、加熱処理では24検体からレジオネラ属菌が分離され、処理工程を併用することにより、効率よくレジオネラ属菌が検出された。各種分離培地の併用や雑菌処理工程の併用など培養チャンスを多くすることが検出率アップにつながり、レジオネラ感染症の危険性を回避することに貢献できると考える。

LAMP 法において、レジオネラ属菌数が

少ない検体の場合等は、検査結果にバラツキが生じやすく、培養法(+)LAMP法(-)の不一致の一因として考えられた。

比色系パルサー法については、方法①で実施した不安定な結果は、上清除去時にロスが生じたこと、ターゲットがRNAであるために壊れやすいことが理由として考えられた。そのため、濃縮検体をすぐに溶菌処理した方法②で実施したところ、5cfu/100mlといったレジオネラ属菌数の少ない検体においても感度良く検出できた。しかし、培養法(+)パルサー(-)となる検体も存在し、泉質など菌種以外の要因が検出に影響することが考えられた。LAMP法とともに、今後、事例を積み重ねて検証していく必要がある。

E. まとめ

入浴施設における浴槽等の清掃・消毒効果を確認するための衛生管理手法として、迅速に結果が得られるLAMP法や比色系パルサー法を導入することは効果的ではあるが、菌量が少ない場合、多種多様な泉質を有する温泉水の場合は、見逃しの危険性がある。また、「100mlあたり10cfu以下であること」という基準がある限り、培養法の併用は必須である。そこで、培養法における正確・

迅速化を図るため、斜光法を取り入れた方法を併用することにより、迅速な行政対応が可能になるものと考えられる。今後、斜光法を含めた標準的検査法を提示し、精度高いレジオネラ属菌検査を普及するための研修システムを確立し、民間検査機関への精度管理導入に向け、今後の検討を図っていきたい。

参考文献

- 1 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. 環境感染誌, 2010. 25(1):8-14

F. 研究発表等

1. 佐々木麻里:レジオネラ症に係る最近の知見と検査の取り組み、平成27年度環境監視員担当者会議、2015年5月、大分.
2. 佐々木麻里:レジオネラ症にご注意、衛生環境研究センターだより No.25:1-2, 2016.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fig.1 比色系パルサー法

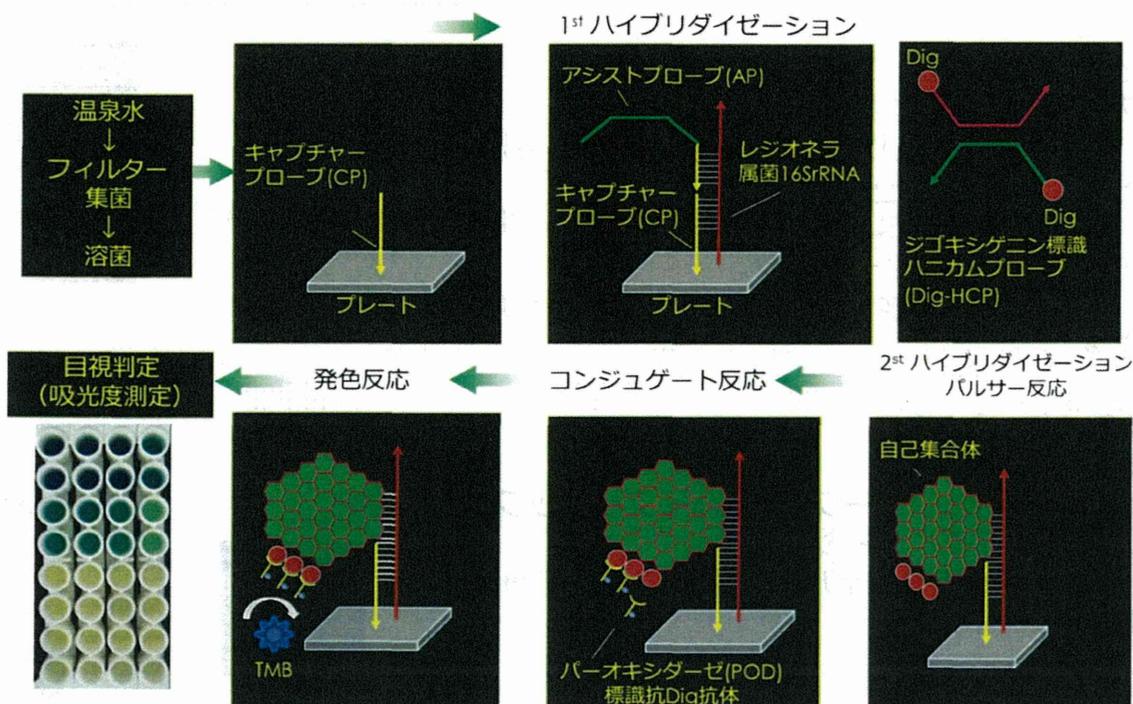


Table 1 培養法の結果

採水箇所		検体数	検出数 ^a	検出率
掛け流し式	浴槽水	14	7	50%
	湯口水	14	6	43%
循環式	浴槽水	11	6	55%
	湯口水	11	6	55%
計		50	25	50%

^a 10cfu/100m によらない(定性)

Table2 浴槽水と湯口水の検出状況 (n=25)

		浴槽水		計
		+	-	
湯口水	+	10	2	12
	-	3	10	13
計		13	12	25

10cfu/100m によらない(定性)

Table 3 雑菌処理と分離培地の検出感度 (n=50)

		未加熱	加熱	
WYO	GVPC	MWY	17	20
WYO	GVPC		0	0
WYO		MWY	2	1
	GVPC	MWY	1	0
WYO			0	1
	GVPC		1	2
		MWY	1	0
	計		22	24

Table 3-1 雑菌処理と分離培地の検出感度 (n=50)

	未加熱	加熱
WYOα(市販品)	19	22
GVPC(市販品)	19	22
MWY(自家製)	21	21

10cfu/100m によらない(定性)

Table 4 血清群別の陽性検体数(n=50)

血清群	検体数	
SG1	6	Lag1 (-)
SG2	3	
SG3	11	
SG5	6	
SG6	13	
SG7	3	
SG9	1	
SG10	1	
SG15	3	
SGUT	13	重複有り

Table 5 LAMP 法と培養法の比較 (n=50)

	LAMP		計	
	+	-		
培養法	+	23	2	25
	-	10	15	25
計	33	17	50	

10cfu/100m によらない(定性)

Table 6-1 方法①パルサー法と培養法の比較 (n=18)

	パルサー		計	
	+	-		
培養法	+	3	5	8
	-	1	9	10
計	4	14	18	

10cfu/100m によらない(定性)

Table 6-2 方法②パルサー法と培養法の比較 (n=32)

	パルサー		計	
	+	-		
培養法	+	13	4	17
	-	5	10	15
計	18	14	32	

10cfu/100m によらない(定性)

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）

レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における
衛生管理手法に関する研究

平成 27 年度分担研究報告書

Legionella pneumophila 臨床分離株の収集と 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* 血清群 1 環境分離株について、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 法) をして、minimum spanning tree 解析を行うと、ほとんどが浴槽水分離株から成る B1、B2、B3 の 3 グループ、冷却塔水分離株が多い、C1、C2 グループ、土壌、水溜り分離株が多い、S1、S2、S3 グループ、様々な由来の菌株から成る U グループの 9 つに分かれることを見出している。レジオネラレファレンスセンターで昨年度収集した 67 株の *L. pneumophila* 臨床分離株について遺伝子型別を行い、そのうち血清群 1 の 61 株についてはどのグループに属するか調べた。

A. 研究目的

Legionella pneumophila の遺伝子型別法として世界的に普及している SBT 法を用いて、臨床分離株の遺伝子型別を行い、環境分離株の遺伝子型と比較した。

B. 研究方法

昨年度レジオネラレファレンスセンターで収集されたレジオネラ臨床分離株 67 株は、すべて *L. pneumophila* だったので、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) をを行い、遺伝子型 (ST) を決定し^{1,2)}、遺伝子型別を行った。血清群 1 株については、どのグループに属するかを minimum spanning tree (MST) 解析 (BioNumerics, Applied Maths 社) により確認した。MST 解析により、*L. pneumophila* 血清群 1 株は、ほとんどが浴槽水分離株から成る B1、B2、B3 の 3 グループ、冷却塔水分離株が多い、C1、C2

グループ、土壌、水溜り分離株が多い、S1、S2、S3グループ、様々な由来の菌株から成るUグループの9つに分かれることを見出している³⁾。

C. 研究結果

昨年度レファレンスセンターで収集したレジオネラ臨床分離株67株は、表1の通りで、血清群1が61株、血清群3、4、6、8、9、13が各1株だった。感染源が、浴槽水と推定・確定されている例は28例(42%)だった。SBT法による遺伝子解析を行い、血清群1株については、MST解析により、どのグループに属するか決定した。

推定感染源からの環境分離株とPFGEが一致している菌株は6株あった。4例は浴槽水分離株で、1例は冷却塔水、1例は散水ホースによる2011年に分離された菌株である。浴槽水が感染源だった4事例のうち、3事例の菌株は、浴槽水分離株が多いBグループに属していた。1事例の菌株は土壌からの分離株が多いS1グループに属するST23だったが、ST23は、今までの入浴施設における集団感染事例の起原菌として最も多い遺伝子型であることが知られている。冷却塔水による感染事例はST1(冷却塔水分離株が多いC1グループに属する)の菌株によるものであった。庭の散水ホースによる感染事例の菌株はS1グループに属していた。今年度も昨年度と同数の6例の土壌による感染の可能性が推定されている。そのうち、血清群1株が起原菌であったものは5例

あり、すべてSグループに属していた。

D. 考察

昨年度は、レジオネラレファレンスセンターにおいて、67株が収集され、遺伝子型別が行われた。感染源調査のために、臨床検体から菌株を分離することの重要性が周知されるにつれて、地方衛生研究所において、レジオネラ臨床分離例が増えていると思われる。

L. pneumophila 血清群1株については、環境分離株の由来により遺伝子型に特徴があることが明らかとなっており、臨床分離株の感染源の種類とも相関があることが、今回の結果から推測された。

謝辞

今回解析した分離株を分与くださった内田順子(香川県環境保健研究センター)、笠原ひとみ(長野県環境保全研究所)、勝川千尋(大阪府立公衆衛生研究所)、川上慶子(石川県保健環境センター)、金谷潤一(富山県衛生研究所)、小堀すみえ(さいたま市健康科学研究センター)、清水麻衣(京都市衛生環境研究所)、杉谷和加奈(熊本市環境総合センター)、富田望(福島県衛生研究所)、中嶋洋(岡山県環境保健センター)、野田万希子(岐阜県保健環境研究所)、福司山郁恵(熊本県保健環境科学研究所)、細谷美佳子(新潟県保健環境科学研究所)、松永典久(福岡市保健環境研究所)、宮下安子(川崎市健康安全研究所)、山口友美(宮城県保健環境センター)、吉野修司(宮崎県衛生環境研究所)、

表 1 2014 年度に収集した臨床分離株(67 株)

分離 No.	年	性別	感染源	PFGE	NIB (受付番 号)	種名	血 清 群	ST (Sequence Type)	ST										Group (SG1)	同じSTの報告があるか
									flaA	pilE	asd	mip	mompC	proA	neuA	1	2	3		
322	2014	男	不明(1回/2日のペースで近隣の温泉、菌不検出)		3164	<i>L. pneumophila</i>	1	1756	3	13	1	21	11	9	9	(U)	無			
323	2013	男	不明		3183	<i>L. pneumophila</i>	1	1773	6	43	15	6	21	7	53	N	無			
324	2014	男	温泉(推定)		3184	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	B3	国内18例目			
325	2014	女	不明		3185	<i>L. pneumophila</i>	1	118	12	8	11	20	5	12	6	S3	国内3例目			
326	2014	男	不明		3186	<i>L. pneumophila</i>	1	353	8	10	6	15	51	1	6	S1	国内6例目			
327	2014	男	温泉(推定)		3187	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内21例目、国外			
328	2014	男	不明		3192	<i>L. pneumophila</i>	1	1798	7	10	17	10	13	4	11	B2	無一国内			
329	2014	男	銭湯(推定)		3193	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内19例目、国外			
330	2014	男	温泉(推定)		3194	<i>L. pneumophila</i>	1	505	7	6	17	3	11	11	9	B2	県内5例目			
331	2014	男	不明		3200	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	C1	国内17例目、国外			
332	2013	女	浴槽(集団感染、高齢者福祉施設)	一致	3201	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内22例目、国外			
333	2014	男	不明		3202	<i>L. pneumophila</i>	1	550	2	3	6	10	51	1	6	S1	国内4例目			
334	2014	男	草刈り(推定)		3204	<i>L. pneumophila</i>	1	507	2	3	5	10	2	1	6	S1	国内5例目			
335	2014	男	温泉(毎日利用、当該区分離されず)		3205	<i>L. pneumophila</i>	9	1808	4	8	11	25	11	12	2	-	無			
336	2014	男	不明		3206	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内23例目、国外			
337	2014	男	不明(水槽水検査中)		3208	<i>L. pneumophila</i>	1	42	4	7	11	3	11	12	9	N	国内8例目、国外			
338	2014	男	不明(草刈り)		3209	<i>L. pneumophila</i>	1	739	12	8	11	2	10	12	2	S3	国内2例目、日本・中国環境			
339	2014	男	土壌(推定、大工)		3210	<i>L. pneumophila</i>	13	1826	12	10	5	10	18	1	209	-	無			
340	2014	男	不明		3216	<i>L. pneumophila</i>	1	1847	2	3	5	12	2	1	6	S1	無			
341	2014	男	不明(整備員)		3217	<i>L. pneumophila</i>	1	1845	21	27	28	28	15	29	9	N	無			
342	2014	男	土壌(推定、清掃等)		3220	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内24例目、国外			
343	2014	男	循環風呂(推定)		3224	<i>L. pneumophila</i>	1	1846	2	3	9	12	2	1	20	S1	無			
344	2014	女	院内感染(冷却塔)	一致	3243	<i>L. pneumophila</i>	1	1	1	4	3	1	1	1	1	C1	国内18例目、国外			
345	2007	男	公衆浴場(推定)		3245	<i>L. pneumophila</i>	1	256	6	10	14	5	39	14	9	(B1)	国内4例目、国外、国内環境(シャワー)			
346	2007	男	公衆浴場(推定、PFGE一致せず)		3246	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内20例目、国外			
347	2008	男	入浴施設(推定、血清群一致せず)		3247	<i>L. pneumophila</i>	1	143	4	17	11	23	5	12	19	N	国内2例目、国外			
348	2011	男	家庭菜園の散水ホース	一致	3248	<i>L. pneumophila</i>	1	1865	2	3	46	13	2	5	6	S1	無			
349	2014	男	不明		3249	<i>L. pneumophila</i>	1	1867	21	14	29	11	15	29	6	N	無			
350	2014	男	不明		3250	<i>L. pneumophila</i>	8	1866	17	23	13	20	32	22	205	-	無			
351	2014	男	公衆浴場(推定)		3251	<i>L. pneumophila</i>	1	502	6	10	19	3	19	4	6	B1	国内3例目			
352	2014	男	不明(家庭園芸をする程度)		3253	<i>L. pneumophila</i>	3	465	2	29	2	5	50	20	15	-	国内1例			
353	2014	男	畑で農作業(推定)		3254	<i>L. pneumophila</i>	1	120	2	3	5	11	2	1	6	S1	国内20例目、国外			
354	2014	男	不明		3260	<i>L. pneumophila</i>	1	1924	2	3	9	12	2	1	6	S1	無			
355	2012	男	24時間風呂(推定)		3261	<i>L. pneumophila</i>	1	507	2	3	5	10	2	1	6	S1	国内6例目			
356	2013	男	自宅の24時間風呂(推定)		3262	<i>L. pneumophila</i>	1	1964	6	10	17	28	19	14	6	B1	無			
357	2014	男	不明		3263	<i>L. pneumophila</i>	1	48	5	2	22	27	6	10	12	S2	無			
358	2014	男	不明		3264	<i>L. pneumophila</i>	1	1480	3	13	1	14	14	9	6	U	国内2例目			
359	2014	女	不明		3265	<i>L. pneumophila</i>	4	1966	6	6	15	6	4	14	11	無	無			
360	2014	男	温泉(推定)		3266	<i>L. pneumophila</i>	1	42	4	7	11	3	11	12	9	N	国内9例目、国外			
361	2014	男	温泉(推定)		3267	<i>L. pneumophila</i>	1	42	4	7	11	3	11	12	9	N	国内10例目、国外			
362	2014	男	入浴施設(推定、スポーツジム)		3268	<i>L. pneumophila</i>	1	1965	4	3	18	28	5	1	9	N	無			
363	2014	男	不明		3269	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内26例目、国外			
364	2014	男	24時間風呂(推定)		3270	<i>L. pneumophila</i>	1	1933	7	10	19	10	19	4	6	B1	無			
365	2013	男	自宅(風呂水、貯水槽水)	一致	3275	<i>L. pneumophila</i>	1	1857	6	6	3	28	9	4	11	B1	国内環境株(シャワー)			
366	2013	男	不明		3276	<i>L. pneumophila</i>	1	1187	2	3	5	13	2	1	6	S1	国内環境株(水溜り)			
367	2013	男	不明		3277	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内25例目、国外			
368	2013	男	不明(家庭菜園?)		3278	<i>L. pneumophila</i>	1	294	8	3	3	15	21	1	6	S1	国内2例目、国外			
369	2013	男	不明(タクシー運転手)		3279	<i>L. pneumophila</i>	1	905	2	3	9	13	56	5	6	S1	国内2例目			
370	2013	男	温泉(推定)		3280	<i>L. pneumophila</i>	1	507	2	3	5	10	2	1	6	S1	国内7例目			
371	2013	男	不明		3281	<i>L. pneumophila</i>	6	1945	6	6	15	6	4	14	9	無	無			
372	2014	男	不明		3282	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内27例目、国外			
373	2015	女	浴室シャワー(推定)		3288	<i>L. pneumophila</i>	1	566	6	10	20	13	21	14	11	B1	国内3例目			
374	2014	男	公衆浴場(推定)		3289	<i>L. pneumophila</i>	1	502	6	10	19	3	19	4	6	B1	国内4例目			
375	2015	男	不明(仕事でスチーム洗浄作業)		3290	<i>L. pneumophila</i>	1	1187	2	3	5	13	2	1	6	S1	国内2例目、環境(水溜り)			
376	2014	男	不明(旅行歴)		3291	<i>L. pneumophila</i>	1	9	3	10	1	3	14	9	11	U	国外			
377	2014	男	不明		3292	<i>L. pneumophila</i>	1	211	3	10	1	1	14	9	11	U	国内4例目、国外4例			
378	2014	男	不明(市場で魚輸送)		3293	<i>L. pneumophila</i>	1	89	4	10	11	15	29	1	6	(S1)	国内7例目、国外			
379	2015	男	不明		3294	<i>L. pneumophila</i>	1	42	4	7	11	3	11	12	9	N	国内11例目、国外			
380	2015	男	入浴施設(スポーツジム)	一致	3305	<i>L. pneumophila</i>	1	642	2	10	3	10	9	14	6	B1	国内3例め			
381	2015	男	温泉	一致	3308	<i>L. pneumophila</i>	1	138	10	12	7	3	16	18	6	B3	国内19例目			
382	2015	男	不明		3309	<i>L. pneumophila</i>	1	507	2	3	5	10	2	1	6	S1	国内8例目			
383	2015	男	公衆浴場の利用あり		3310	<i>L. pneumophila</i>	1	353	8	10	6	15	51	1	6	S1	国内7例目			
384	2015	男	公衆浴場の利用あり		3311	<i>L. pneumophila</i>	1	353	8	10	6	15	51	1	6	S1	国内8例目			
385	2015	男	不明		3312	<i>L. pneumophila</i>	1	142	2	10	3	13	9	4	18	B1	国内4例目			
386	2015	男	不明(自家用車の加温器レジオネラ陰性)		3313	<i>L. pneumophila</i>	1	23	2	3	9	10	2	1	6	S1	国内28例目、国外			
387	2015	男	公衆浴場の利用あり		3314	<i>L. pneumophila</i>	1	353	8	10	6	15	51	1	6	S1	国内9例目			
388	2015	男	公衆浴場の利用あり		3315	<i>L. pneumophila</i>	1	353	8	10	6	15	51	1	6	S1	国内10例目			

血清群 1 株については MST 解析により属するグループを示した。N はいずれのグループにも属していないことを示す。括弧表記は、最も近いグループだが、3 遺伝子座が異なり、現時点では属していないことを示している。

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。

E. 参考文献

- 1) Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R,

- 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-acylneuraminyl 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) 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）「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」平成 26 年度総括・分担研究報告書. 研究代表者: 倉 文明.
- F. 研究発表
学会発表
- 1) 高野さかえ, 前川純子, 倉 文明, 山元 佳: 呼吸器検体から菌の分離を経ず直接 Sequence-based typing 法を行ったレジオネラ肺炎症例. 第 89 回日本感染症学会学術講演会. 2015 年 4 月, 京都.
- 2) Junko Amemura-Maekawa, Kyoko Chida, Hitomi Ohya, Junko Isobe, Jun-ichi Kanatani, Shinobu Tanaka, Hiroshi Nakajima, Shuji Yoshino, Makoto Ohnishi and Fumiaki Kura: Genetic features of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* SG1 in Japan. ESGLI 2015. London. September 2015.
- 3) 西堀武明, 前川純子: *Legionella pneumophila* 血清群 13 によるレジオネラ肺炎の 1 例. 日本感染症学会第 62 回東日本地方会学術集会. 2015 年 10 月, 札幌.

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）

レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究
平成 27 年度分担研究報告書レジオネラの遺伝子型別：臨床分離株、多様な生息環境由来株の収集と型別、感染源調査
川崎市内で分離された環境中のレジオネラ属菌の SBT 法による型別

研究分担者	前川 純子	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	淀谷 雄亮	川崎市健康安全研究所

A. 研究目的

レジオネラ属菌は土壌や環境水など多様な環境に生息しているが、レジオネラ症例の感染源は不明であることが多く、感染源の推定のために環境由来株の遺伝型別を把握しておくことは重要である。川崎市健康安全研究所において浴槽水や冷却塔水等から分離された *Legionella pneumophila* SG1 について Sequence-based typing (SBT)法にて型別を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 対象

平成 23 年から平成 27 年までに川崎市健康安全研究所に搬入された冷却塔水及び浴槽水等から分離された *Legionella pneumophila* SG1 計 31 株を対象とした。

2. 方法

採水後の検水 500mL を孔径 0.2 μm のポリカーボネートタイプメンブレンフィルター（アドバンテック）で吸引ろ過し、フィルターを滅菌蒸留水 5 ml で 1 分間攪拌し懸

濁液とした。拭取り検体はよく攪拌したものをそのまま懸濁液とした。懸濁液を 5 分間酸処理した後、レジオネラ GVPC 寒天培地（日研生物）に塗布し 7 日間培養した。L-システイン要求性のコロニーをレジオネラ属菌として分離し、レジオネラ免疫血清（デンカ生研）にて血清群を決定した。SBT 法については EWGLI (European Working Group of Legionella Infections) が公開しているプロトコールに従い、シークエンスにて *flaA*、*pile*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部領域の塩基配列を決定し、遺伝子型別を行った。

C. 結果及び考察

遺伝子型別の結果及び国内分離株のグループ分けを表 1 に示す。今回解析した 31 株は新規 ST3 種を含む 15 種の ST に分類された。ST2075、ST2076 及び ST2077 についてはデータベースに登録がなかったタイプであったため新規に登録した。今回分離された 31 株中 23 株、15 種の ST のうち 8 種は国内外で臨床分離株として報告されて

いる ST であり、当該施設がレジオネラ症の原因施設となりうることが示された。由来環境別においては、冷却塔水由来の 12 株はすべて ST1 (C1) であった。浴槽水由来の 13 株は 12 種の ST に分類され、同一施設の浴槽拭取り由来株は 2 株とも ST1 であった。浴槽水由来株は B1 及び B2 に含まれる株が多かったが、ST1151 (N) や ST48 (S2) も分離された。採暖槽水由来 4 株は ST48 (S2)、ST384 (S1)、ST552 (B2) 及び ST2076 (B2) であり、さまざまなグループに分布した。今回 2 検体で分離されている ST48 については、検体を採取した施設は別の地域にあり、特に関係性は見られなかった。過去にも別施設から ST48 が検出されており、川崎市内において環境中に広く分布している ST である可能性が示唆された。また、ST552 においても 2 施設で分離されているが、同様に施設の関係性は特になかった。しかし、同一施設で過去にも ST552 が検出されており、この施設においては洗浄不足か汚染源が存在する可能性が示唆された。採暖槽水 No.25 から検出された ST384 は患者から分離されることが多く¹⁾、川崎市内において過去に患者から同一の ST が分離されており注意すべき ST であると考えられる。

D. まとめ

川崎市において分離された *Legionella*

pneumophila SG1 について SBT 法で型別したところ、新規登録の 3 種を含む 15 種の ST に分類され、うち 8 種は国内外で臨床分離株として報告されている ST であり、当該施設がレジオネラ症の原因施設となりうることを示された。冷却塔水由来株は既報¹⁾と同様に臨床分離例及び環境分離例の多い ST1 が分離された。関連のない施設から同一の ST が分離されたため、ST1 と同様に広く分布する ST がある可能性が示唆された。今後もさまざまな環境由来のレジオネラ属菌について ST を調査し環境中のレジオネラ属菌の分布状況を把握することで、レジオネラ症の感染源調査や新たな感染源の推定に寄与していきたい。

E. 参考文献

1) 前川純子ら：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 (IASR Vol. 34 p. 161-162: 2013 年 6 月号)

F. 健康危険情報

なし

G. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 *Legionella pneumophila* SG1 の遺伝子型別

No.	施設	検体種別	ST	グループ	分布*
1	スポーツ施設	採暖槽水	48	S2	国内外臨床例あり
2	高齢者福祉施設	浴槽水	2075	B1	新規遺伝子型
3	スポーツ施設	浴槽水	1151	N	国内環境
4	高齢者福祉施設	冷却塔水	1	C1	国内外臨床例あり
5	旅館	浴槽水	1254	B2	国外臨床例あり
6	旅館	浴槽水	128	B2	国内環境
7	スポーツ施設	浴槽水	552	B2	国内臨床例あり
8	スポーツ施設	採暖槽水	2076	B2	新規遺伝子型
9	公衆浴場	浴槽水	48	S2	国内外臨床例あり
10	公衆浴場	浴槽水	614	B1	国内環境
11	公衆浴場	浴槽水	2077	B1	新規遺伝子型
12	公衆浴場	浴槽水	129	B1	国内外臨床例あり
13	高齢者福祉施設	浴槽水	552	B2	国内臨床例あり
14	高齢者福祉施設	冷却塔水	1	C1	国内外臨床例あり
15	高齢者福祉施設	冷却塔水	1	C1	国内外臨床例あり
16	高齢者福祉施設	冷却塔水	1	C1	国内外臨床例あり
17	高齢者福祉施設	冷却塔水	1	C1	国内外臨床例あり
18	高齢者福祉施設	冷却塔水	1	C1	国内外臨床例あり
19	高齢者福祉施設	冷却塔水	1	C1	国内外臨床例あり
20	高齢者福祉施設	冷却塔水	1	C1	国内外臨床例あり
21	高齢者福祉施設	冷却塔水	1	C1	国内外臨床例あり
22	高齢者福祉施設	冷却塔水	1	C1	国内外臨床例あり
23	高齢者福祉施設	冷却塔水	1	C1	国内外臨床例あり
24	高齢者福祉施設	冷却塔水	1	C1	国内外臨床例あり
25	スポーツ施設	採暖槽水	384	S1	国内臨床例あり
26	スポーツ施設	採暖槽水	552	B2	国内臨床例あり
27	高齢者福祉施設	浴槽拭取り	1	C1	国内外臨床例あり
28	高齢者福祉施設	浴槽拭取り	1	C1	国内外臨床例あり
29	公衆浴場	浴槽水	1293	B1	国外環境
30	公衆浴場	浴槽水	763	B1	国内外臨床例あり
31	公衆浴場	浴槽水	59	B2	国内外臨床例あり

* EWGLI の *Legionella pneumophila* Sequence-Based Typing database による (2016 年 3 月 9 日現在)。

Legionella pneumophila SG1 の国内分離株を遺伝子型でグループ分けすると、浴槽水分離株が多く含まれる B1, B2, B3、冷却塔水分離株が多く含まれる C1, C2、土壌・水たまり分離株が多く含まれる S1, S2, S3、感染源不明の臨床分離株が多い U グループの大きく 9 つに分かれる。いずれのグループにも属していないものは N と表記する。

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）

レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における

衛生管理手法に関する研究

平成 27 年度分担研究報告書

レジオネラ属菌未記載種の解析

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：16S rRNA 遺伝子および *mip* 遺伝子配列の解析から、既存種に当てはまらない日本各地の環境から分離されたレジオネラ属菌株について、菌体脂肪酸組成分析を行った。土壌、あるいは源泉水から分離された 6 株は、菌体脂肪酸組成の類似度が高く、未記載の同一種であると考えられた。本未記載種は、*Legionella pneumophila* 3 群、あるいは 10 群の抗血清と交差反応を示すが、DNA 類似度から *L. pneumophila* とは別種と考えられ、菌体脂肪酸組成分析からもそのことが確認できた。さらに詳細な遺伝子解析、および生化学的性状等を確認することにより、新種として提唱したいと考えている。

A. 研究目的

レジオネラ症の起因菌であるレジオネラ属菌は、本来環境に生息する菌で、現在までに 58 菌種が報告されている。そのうち、ヒトから分離されたり、血清抗体価の上昇が確認されたりした菌種は 30 種だが、当初環境から分離され、その後、臨床から分離されたものもあり、レジオネラ属菌全種がヒトに病原性をもつ可能性があると考えられている。我が国の温泉水等の環境から分離されたレジオネラ属菌で、16S rRNA 遺伝子および *mip* 遺伝子の塩基配列解析の結果、既存種でないと考えられた菌株について、菌種決定のために必要な菌体脂肪酸組成分析を

MIDI 法で行い、データベースのレジオネラ属既存種と比較した。

B. 研究方法

用いた菌株は表 1 に示した。

16S rRNA 遺伝子塩基配列配列と、*mip* 遺伝子塩基配列解析のためのプライマーは、既報¹⁾に従った。一部の菌株については *proA* 遺伝子配列¹⁾も解析した。得られた塩基配列は、GenBank (NCBI, USA) に対して Blast 検索を行い、相同性の高い配列を探した。

菌体脂肪酸組成分析は、株式会社テクノスルガ・ラボ（静岡県）に委託して行った。脂肪酸抽出、測定は、Sherlock Microbial

表 1 菌体脂肪酸組成分析に用いた菌株

菌株番号	分離年	由来	抗原交差性・自発蛍光	16S rRNA 遺伝子配列	mip 遺伝子配列
NIIB0236	1999	冷却塔水、病院、東京都	青白色蛍光	<i>L. sp.</i> 8207 ¹⁾	<i>L. sp.</i> D4585 ²⁾
NIIB0383	2002	温泉スタンド水、入浴施設、宮崎県	<i>L. pneumophila</i> SG3	Group R1	Group M1
NIIB0410	2002	源泉タンク水、入浴施設、宮崎県	<i>L. pneumophila</i> SG3	Group R1	Group M1
NIIB1169	2005	浴槽水、公衆浴場、埼玉県		<i>L. sp.</i> D3923 ²⁾ (98.8%)	新規
NIIB2131	2006	温泉、浴槽水、長崎県	青白色蛍光	<i>L. sp.</i> 99-113 ²⁾	<i>L. sp.</i> 99-113 ²⁾
NIIB2330	2001	土壌	<i>L. pneumophila</i> SG3	Group R1	Group M1
NIIB2331	2001	土壌	<i>L. pneumophila</i> SG3	Group R1	Group M1
NIIB2358	2001	土壌	<i>L. pneumophila</i> SG10	Group R1	Group M1
NIIB2556	2006	温泉水、湯口、北海道		<i>L. sp.</i> 4561 ¹⁾	<i>L. sp.</i> H (911) ³⁾
NIIB2557	2007	温泉水、大浴場、北海道		<i>L. sp.</i> 4561 ¹⁾	<i>L. sp.</i> H (911) ³⁾
NIIB2558	2006	温泉水、大浴場、北海道	<i>L. pneumophila</i> SG13	<i>L. norrlandica</i> ⁴⁾	<i>L. norrlandica</i> ⁴⁾
NIIB2652	2010	温泉水、浴槽水、東京都		<i>L. thermalis</i> ⁵⁾	データ得られず
NIIB2888	2012	温泉水、露天風呂、東京都		<i>L. thermalis</i> ⁵⁾	データ得られず
NIIB3046	2013	原湯、岡山県	<i>L. pneumophila</i> SG3	実施せず	Group M1
NIIB3108	2013	蛇口水、家庭洗面所、神奈川県	青白色蛍光	<i>L. sp.</i> L-29 ⁶⁾	実施せず

16S rRNA 遺伝子配列の欄には、特に記載のないものについては 99%以上、mip 遺伝子配列の欄には 95%以上の相同性を示した菌種を記した。Group R1 は互いに 98.9%以上、Group M1 は互いに 97%以上の相同性を示した。1) Paveenkittiporn W *et al*, Infect Genet Evol, 2012, 12:1368. 2) Ratcliff RM, Methods in Mol Biol, 2013, 954:57. 3) Ratcliff RM *et al*, J Clin Microbiol, 1998, 36:1560. 4) Rizzardi K *et al*, Int J Syst Evol Microbiol, 2015, 65:598. 5) Ishizaki N *et al*, Microbiol Immunol, 2016, doi: 10.1111/1348-0421.12366. 6) Inoue *et al*, Microbes Environ, 2015, 30:108.

表 2 脂肪酸組成のプロファイル^{a)}

菌株番号	脂肪酸組成 (%)													
	i14:0	a15:0	15:1 w6c	i16:1 H	i16:0	C16:1 w7c / 16:1 w6c	16:0	i17:0	a17:0	cyc17:0	17:0	18:0	19:0	20:0
NIIB0236	2.03	26.71	2.02	-	11.13	23.71	10.22	0.95	11.65	1.36	2.98	2.48	0.76	0.65
NIIB0383	5.42	17.87	2.13	1.54	22.64	14.45	12.41	0.52	6.16	1.40	0.64	4.23	0.91	4.62
NIIB0410	5.07	15.22	2.60	2.13	25.51	17.07	11.97	0.26	5.70	1.47	0.82	3.66	0.97	4.37
NIIB1169	1.05	40.01	5.17	-	7.31	21.51	8.27	0.58	8.51	0.17	0.53	0.52	0.12	0.94
NIIB2131	5.43	25.65	2.83	-	19.42	18.40	10.51	1.50	8.35	1.48	2.22	0.89	-	0.60
NIIB2330	7.97	12.98	2.41	1.79	32.16	11.71	10.17	0.42	4.42	2.13	0.85	3.58	1.03	3.80
NIIB2331	7.61	21.81	1.38	2.23	30.60	12.30	7.59	0.48	6.75	0.27	0.57	2.60	0.39	2.07
NIIB2358	7.50	20.50	1.96	2.40	25.70	13.78	9.23	0.38	5.90	1.83	-	2.75	0.55	3.21
NIIB2556	0.59	17.11	0.77	-	10.43	25.79	11.39	2.36	21.77	0.56	-	1.27	2.62	1.40
NIIB2557	0.95	29.46	1.25	-	12.98	17.72	6.94	1.65	20.82	-	-	0.72	1.30	0.73
NIIB2558	5.40	17.31	1.94	0.64	36.94	16.73	5.21	-	8.38	1.61	0.41	1.02	-	-
NIIB2652	3.44	30.15	4.09	-	19.70	14.94	7.65	0.29	11.8	-	0.70	1.32	0.49	0.80
NIIB2888	15.26	13.36	6.73	-	35.63	11.16	6.00	-	3.18	-	1.02	1.51	0.82	0.85
NIIB3046	5.63	9.36	1.83	2.15	27.98	16.24	14.33	0.33	3.68	2.98	0.92	4.58	1.06	4.56

^{a)} いずれかの菌株で 2%を越える脂肪酸の種類について表示した。

・ 検出されなかった。

Identification System (Version 6.0) (MIDI, DE, USA)の操作マニュアルに従い、データベースとして、Calculation Method CLIN6 およびライブラリ CLIN6 6.20 を用いた。

C. 研究結果

菌体脂肪酸組成分析の結果は表 2 の通りであった。データベースと照合したところ、いずれの菌株も既存種のレジオネ

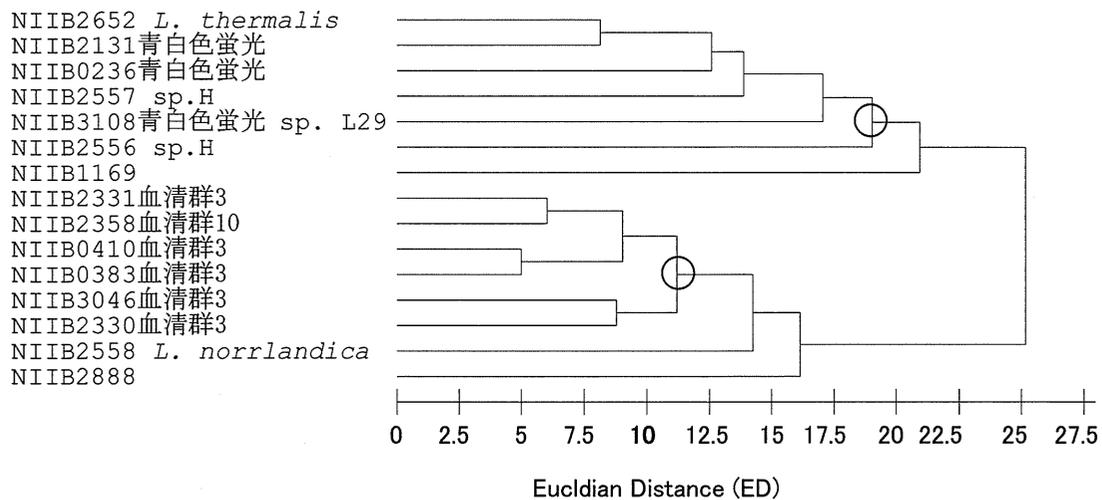


図 1. 菌体脂肪酸組成分析のデータによる Sherlock System を用いて作成した系統樹(テクノスルガ・ラボによる)。

ED 値が 10 以下の時は同一種の可能性が高く、6 以下の時、同一亜種の可能性が高く、2.5 以下の時、同一株と考えられる。

ラ属菌と一致しなかった。さらに、菌体脂肪酸組成の類似度から系統樹を作成した(図 1)。

16S rRNA 遺伝子塩基配列と *mip* 遺伝子塩基配列の結果から、NIIB0383、NIIB0410、NIIB2330、NIIB2331、NIIB2358、NIIB3046 は 1 未記載種を形成していると考えられた(表 1)が、菌体脂肪酸組成の類似度からも、この 6 菌株は同一種の可能性が高いと考えられた。

NIIB2652 と NIIB2888 は、*mip* 遺伝子が増幅せず、解析ができなかった。16S rRNA 遺伝子塩基配列は互いに 99%以上の相同性を示したが、*proA* 遺伝子塩基配列は 5.4%異なっており、菌体脂肪酸組成も異なっていた(図 1)ため、別種であることが分かった。

NIIB2556 と NIIB2557 は、16S rRNA、*mip*、*proA* 遺伝子塩基配列が同一だったにも関わらず、菌体脂肪酸組成分析の結果からは、別種であると考えられた。

NIIB0236 は *mip* 遺伝子塩基配列が *L. sp. D4585* と、16S rRNA 遺伝子塩基配列が *L. sp. 8207* とそれぞれ一致し、菌体脂肪酸組成は既存種と一致するものはなかった。

NIIB1169 の 16S rRNA 遺伝子塩基配列は *L. sp. D3923* と 98.8%の相同性があったが、*mip* 遺伝子は *L. sp. D3923* との相同性は見られず、新規の配列であった(表 1)。

NIIB2131 の 16S rRNA、*mip*、*proA* 遺伝子塩基配列はともに *L. sp. 99-113* と一致した。

NIIB2558 の 16S rRNA および *mip* 遺伝

子塩基配列は、2015年に新種として登録された *Legionella norrlandica*²⁾と一致した。

NIIB3108の16S rRNA 遺伝子塩基配列は、*L. sp.* L-29³⁾の配列と一致した。

D. 考察

NIIB0383、NIIB0410、NIIB2330、NIIB2331、NIIB2358、NIIB3046の6菌株は、*Legionella pneumophila*の血清群3または10の免疫血清と反応する抗原性をもつという特徴があるが、塩基配列解析および菌体脂肪酸組成分析の結果から、*L. pneumophila*とは別種の同一未記載種であると考えられた。*L. pneumophila*と共通の抗原性があることから、*L. pneumophila*と混同される可能性があるが、*L. pneumophila*を特異的に同定する *mip* PCR⁴⁾で陰性となるので容易に区別をすることができる。また、浴槽水からは分離されず、ヒトが入浴しない状況の温泉水から分離されているという特徴がある。この6菌株の *mip* 遺伝子塩基配列による GenBank の Blast 検索の結果から、タイの土壌から分離された *Legionella spp.* F3629、F3673、F3574、F3575、F3577、F3578、F3579、F3587 の8菌株⁵⁾と、*L. pneumophila* serogroup 8⁶⁾の併せて9菌株の *mip* 遺伝子配列がこの6菌株と同一菌株と考えられる高い相同性を示した。*L. pneumophila* serogroup 8と記載された菌株は、本来 *L. pneumophila* でないが血清群8の抗原性を示すための誤記載である可能性が高く、本未記載種に血清群3、10以外に血清群8の免疫血清と反応する株も存在する可能

性が示唆された。

NIIB2652は最近、新種 *Legionella thermalis* と提唱された⁷⁾。NIIB2652とNIIB2888は都内の異なる地域から分離され、16S rRNA 遺伝子塩基配列が99%以上の相同性を示し、両者とも *mip* 遺伝子が増幅せず、解析ができなかったため、当初同じ種に属すると考えていたが、菌体脂肪酸組成が異なっていたため、別種であることが分かった。細菌の16S rRNA 遺伝子塩基配列は種を超えて保存性が高く、レジオネラ属菌において16S rRNA 遺伝子配列がほとんど同じでも別種の場合もある⁸⁾。*mip* 遺伝子の方がレジオネラ属菌の種同定には適している⁹⁾が、今回のように一部の菌株では増幅しないことがある。*mip* 遺伝子同様、種の同定の参考となる遺伝子として最近提唱された *proA* 遺伝子塩基配列を見ると、NIIB2652とNIIB2888の間で5.4%異なっており、別種であると考えられ¹⁾、菌体脂肪酸組成の結果と矛盾しなかった。

NIIB2556とNIIB2557は北海道内の離れた地域から分離された菌株で、16S rRNA、*mip*、*proA* 遺伝子塩基配列はすべて同一だったにも関わらず、菌体脂肪酸組成からは、別種であると考えられた。NIIB2556とNIIB2557の16S rRNA 遺伝子塩基配列は、*L. sp.* 4561¹⁰⁾と、*mip* 遺伝子塩基配列は、*L. sp.* H (911)⁹⁾ (表1)と、*proA* 遺伝子は *L. sp.* IMVS-946¹⁾とそれぞれ完全に一致していた。*L. sp.* 4561と、*L. sp.* IMVS-946の *mip* 遺伝子配列は GenBank に登録されていて、*L. sp.* H (911)