

の *mip* 遺伝子配列とはそれぞれ異なっており、この 3 株は別種と考えられた。したがって、NIIB2556 と NIIB2557 は、調べた 3 遺伝子配列が同一で、それぞれ異なる種の配列と一致し、また、菌体脂肪酸組成は互いに異なっているという非常に興味深い結果となった。この 2 菌株は複数種をまたがるダイナミックな遺伝子再編成により形成された可能性が示唆される。

NIIB0236 は *mip* 遺伝子配列が *L. sp.* D4585<sup>1)</sup>と、16S rRNA 遺伝子配列が *L. sp.* 8207<sup>10)</sup>とそれぞれ一致したが、*L. sp.* D4585 の 16S rRNA 遺伝子配列と、*L. sp.* 8207 の *mip* 遺伝子配列の登録がないために、この 3 株の異同の詳細は不明である。

NIIB2131 の 16S rRNA、*mip*、*proA* 遺伝子塩基配列はともに *L. sp.* 99-113<sup>1)</sup>と一致した。NIIB2131 は温泉から分離された菌株だが、*L. sp.* 99-113 は日本の園芸用土から分離された菌株である。NIIB2131 と *L. sp.* 99-113 は同一の未記載種と考えられる。

NIIB2558 は、その遺伝子配列から、*L. norrlandica* と考えられたが、*L. norrlandica* の新種提唱論文<sup>2)</sup>において菌体脂肪酸組成は報告されず、NIIB2558 との異同は確認できなかった。その後、入手した *L. norrlandica* ATCC 株が *L. pneumophila* 血清群 13 の免疫血清と抗原交差性を持つことが確認され、NIIB2558 が *L. norrlandica* であることの傍証となった。

家庭の蛇口水から分離された NIIB3108 の 16S rRNA 遺伝子配列は、国内の冷却塔から分離された *L. sp.* L-29<sup>3)</sup>と一致したが、

NIIB3108、*L. sp.* L-29 とともに *mip* 遺伝子配列が未実施なので、同一種であるかは確定できなかった。

今後、それぞれの菌株の遺伝子塩基配列の精査を行い、生化学的性状等も確認し、日本の環境に生息するレジオネラ属菌の新種報告を行いたいと考えている。

## E. 結論

我が国の環境から分離されたレジオネラ属菌で、菌種が不明であった 15 菌株について、菌体脂肪酸組成分析を行ったところ、すべて既存種と一致しなかったが、6 菌株は菌体脂肪酸組成の類似性から同一種と考えられた。残りの 9 株は、それぞれ異なる菌種であると考えられた。そのうち、1 株は新種 *L. thermalis* と報告され、1 株は新種 *L. norrlandica* と考えられ、1 株は未記載種 *L. sp.* 99-133 と同一種であると考えられた。

## 謝辞

今回解析した分離株を分与くださった、井上浩章（アクアス株式会社）、大川 元（足立区衛生試験所）、河野喜美子（宮崎県衛生環境研究所）、鈴木敦子（東京都予防医学協会）、中嶋 洋（岡山県環境保健センター）、古畑勝則（麻布大学）、森本 洋（北海道立衛生研究所）、渡辺祐子（神奈川県衛生研究所）（敬称略）の諸氏に感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Ratcliff RM. 2013. Sequence-based

- identification of *Legionella*. In Buchrieser C and Hilbi H (eds.), *Legionella: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, 954:57-72.
- 2) Rizzardi K, Winiecka-Krusnell J, Miriam Ramliden M, Alm E, Andersson S, Byfors S. 2015. *Legionella norrlandica* sp. nov., isolated from the biopurification systems of wood processing plants. *Int J Syst Evol Microbiol*. 65:598-603.
  - 3) Inoue H, Fujimura R, Agata K, Ohta H. 2015. Molecular characterization of viable *Legionella* spp. in cooling tower water samples by combined use of ethidium monoazide and PCR. *Microbes Environ*. 30:108.
  - 4) 病原体検出マニュアル「レジオネラ症」2012年 <http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>
  - 5) Travis TC, Brown EW, Peruski LF, Siludjai D, Jorakate P, Salika P, Yang G, Kozak NA, Kodani M, Warner AK, Lucas CE, Thurman KA, Winchell JM, Thamthitiwat S, Fields BS. 2012. Survey of *Legionella* species found in Thai soil. *Intern J Microbiol Article ID* 218791.
  - 6) Chochlakis D, Sandalakis V, Panoulis C, Goniotakis I, Makridaki E, Tselentis Y, Psaroulaki A. 2013. Typing of *Legionella* strains isolated from environmental samples in Crete, Greece, during the period 2004-2011. *J Water Health*. 11:762-771.
  - 7) Ishizaki N, Sogawa K, Inoue H, Agata K, Edagawa A, Miyamoto H, Fukuyama M and Furuhata K. 2016. *Legionella thermalis* sp. nov., isolated from hot spring water in Tokyo, Japan. *Microbiol Immunol*. doi:10.1111/1348-0421.12366
  - 8) 山崎利雄、前川純子. 日本の環境水から分離される既存の DNA-DNA ハイブリダイゼーションキットにないレジオネラ属菌種の同定. 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「迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究」平成 21 年度総括・分担研究報告書 pp.185-191.
  - 9) Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, and Heuzenroeder MW. 1998. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene. *J Clin Microbiol*. 36: 1560-1567.
  - 10) Paveenkittiporn W, Dejsirilert S, Kalambaheti T. Genetic speciation of environmental *Legionella* isolates in Thailand. *Infect Genet Evol*, 2012, 12:1368-1376.
- F. 研究発表  
なし

富山県の不明感染源解明のための環境調査

研究分担者 磯部 順子 富山県衛生研究所

研究協力者 金谷 潤一 富山県衛生研究所

研究要旨 富山県で多く発生するレジオネラ感染症の感染源として、浴用水のほかに感染源を探求するため、環境中の *Legionella* 属菌の生息状況を平成 24 年より調査している。今年度の調査対象は平成 18 年度から継続している浴用水に加えて、シャワー水 36 検体、河川水 15 検体とした。*Legionella* 属菌の検出率は浴用水で 14/51 検体 (27.5%)、シャワー水では 7/36 検体 (19.4%)、河川水では 6/15 検体 (40.0%) であった。シャワー水の検出率はシャワー水の調査を始めた平成 24 年からの 4 年間でもっとも低かった。また、シャワー水で陽性となった 7 検体のうち、5 検体は井戸水、2 検体は水道水で、昨年同様、井戸水での検出率が高かった。河川水については、昨年度までと採水地点が大きく変更となったにも関わらず、昨年 (44.1%) 同様の検出率であった。

今年度は浴用水とシャワー水から分離された、もしくは厚生センターで分離された *L. pneumophila* SG1 の ST と *lag-1* 遺伝子の保有状況について調べた。調査した 14 株中、3 株が ST502 であったが、分離施設間の関連性は不明であった。*lag-1* 遺伝子について、本遺伝子を保有したのは 7 株 (50.0%) であった。2011~2015 年の 5 年間に浴用水から分離された *lag-1* 遺伝子を保有する *L. pneumophila* SG1 の検出状況は、*Legionella* 属菌が検出された 71 検体のうち、42 検体 (59.2%) から *L. pneumophila* SG1 が検出され、その 33.3% (14 検体) は *lag-1* 遺伝子を保有した。この結果は他の 1 県と比べ、高い傾向であった。

本年度の調査結果からレジオネラ症と河川水の関連性は明らかにはならなかった。しかしながら、全ての調査地点で *Legionella* 属菌が分離されたこともあり、継続して調査する必要があると思われる。また、浴用水やシャワー水から分離される *L. pneumophila* SG1 について、*lag-1* 保有株に注目した調査が必要であると思われる。

A. 研究目的

富山県におけるレジオネラ症の発生状況は、平成 27 年の届出数が 42 件で、平成 18~27 年の 10 年間でもっとも多く、対人口 10 万人の届出数 (3.84) も全国 (1.24) に比べ多い状況が続いている。感染源につい

ては患者の行動様式や職業などから、およそ 35%が浴用水との関連が推定されたが、46%は感染源が不明であった (図 1)。感染源として、浴用水に加え、近年報告されたシャワー水については、ミスト発生リスクから監視する対象となっている<sup>1)</sup>。

そこで、レジオネラ症の発生を予防するため、感染源を明らかにすることを目的として、平成18年度から富山県の公衆浴場の浴用水について *Legionella* 属菌による汚染実態を調査している。加えて浴用水以外の感染源として、シャワー水と患者発生地域の河川水や土壌について *Legionella* 属菌の生息状況を調査してきた。今年度は、浴用水とシャワー水に加え、患者発生と関連しない富山市内を流れる都市河川水を対象として調査した。加えて、患者から多く分離される *L. pneumophila* SG1 について、*lag-1* 遺伝子の保有状況を調査した。

## B. 研究方法

### 1. 感染源調査対象

感染源調査は、公衆浴場の浴用水とシャワー水、河川水を対象とした。浴用水とシャワー水については、対象施設の選択と採水を厚生センター職員に依頼した。河川水については、今年度は富山市内を流れる4河川（松川、赤江川、いたち川、土川）5箇所を採水地点（図2）とした。

### 2. 調査期間と試料

試料は、平成27年9～12月に採取された浴用水51検体とシャワー水34検体である。シャワー水については、温度を40℃に設定後、約10秒間流出させ、容器に採取した。河川水は、平成27年6、8、12月に採水した15検体である。

### 3. *Legionella* 属菌の分離

*Legionella* 属菌の分離は、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 *Legionella* 属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」の精度管理ワーキンググループが推奨する浴用水の方法<sup>2)</sup>に準じて行なった。したがって、試料は非濃縮、濃縮の二通りとなる。

①濃縮方法：試料は、浴用水（500ml）、シャワー水（400 ml）と河川水（1,000 ml）は、メンブランフィルター（直径47 mm, 0.2μm, 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、1分間ボルテックスしたものを試料とした。

②培養法：浴用水、シャワー水は、濃縮、非濃縮検体いずれについても、未処理、酸処理（0.2M KCl-HCl, pH2.2 で等量混合後4分間静置）、加熱処理（50℃20分ヒートブロックで加熱）を行い、その100μlをGVPC培地（日水製薬）にコンラージ棒で広げて35℃で培養した。ただし、酸処理検体は、200μlについて同様に培養した。

河川水は、濃縮検体5mlに、古畑らの報告<sup>3)</sup>にしたがって調整したアメーバ培養液200μlを添加後、35℃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200μlをGVPC培地（日水製薬）2枚にコンラージ棒で広げて、35℃で7日間培養した。

③分離された *Legionella* 属菌の同定：同定は、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<sup>4)</sup>した斜光法で特異的な形態を観察し、血液寒天培地とBCYE-α培地（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-α培地にのみ発育したコロニーについて、レジオネララテックステスト（OXIDO）とレジオネラ免疫血清（デンカ生研）により血清群を決定した。

④SBT：*L. pneumophila* SG1について、STを決定した。方法は前川の報告に準じて行なった<sup>5)</sup>。

⑤ *lag-1* 遺伝子：分離された *L. pneumophila* SG1 11株について、*lag-1* 遺伝子の保有率を調べた。Kozakらの報告

6) したプライマー lag-F : 5' -CTCACACAAGTCA AGCAAC-3' および lag-R : 5' -AAACCATAC CAAA GCAACAT-3' を用い, Go Taq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega) 10  $\mu$ l に lag-F, lag-R (2  $\mu$ M) をそれぞれ 2  $\mu$ l, テンプレート 1  $\mu$ l を加え, 20  $\mu$ l になるよう H<sub>2</sub>O を加え反応液とした. PCR は 95°C 2 分の熱変性後, 94°C 30 秒, 57°C 30 秒, 72°C 1 分を 30 サイクル, 72°C 5 分の条件で thermal cycler DICE (TaKaRa) でおこなった.

### C. 研究結果

#### 1. 浴用水・シャワー水における *Legionella* 属菌検出状況

浴用水およびシャワー水から検出された *Legionella* 属菌の菌数を表 1 に示す. 浴用水 51 検体の *Legionella* 属菌の検出率は 14/51 検体 (27.5%) であった. 2 検体の菌数は 1,000CFU/100ml 以上と高かった. シャワー水の *Legionella* 属菌の検出率は 7/36 検体 (19.4%) で, 陽性 7 検体のうち, 5 検体は井戸水, 2 検体は水道水で, 昨年同様, 井戸水での検出率が高かった. 菌数はもっとも多い検体では 760CFU/100ml であった. 浴用水, シャワー水から分離された *Legionella* 属菌の血清型を表 2 に示した. 分離された *Legionella* 属菌 (UT を除く) の血清群は, 浴用水では 10 種類が認められ, *L. pneumophila* SG6 (4 株) が, シャワー水では 5 種類が認められ, *L. pneumophila* SG3 (3 株) が多かった.

#### 2. 河川水における *Legionella* 属菌検出状況

河川水からの *Legionella* 属菌の検出については, 5 定点のいずれからも検出され, その検出率(表 3) は 6/15 検体 (40.0%) と, 昨年度までと採水地点が大きく変更となっ

たにも関わらず, 昨年 (44.1%) 同様の検出率であった. 河川水から分離された *Legionella* 属菌 7 株の種別では, 浴用水と同じく *L. pneumophila* SG6 が 4 株と多かった.

#### 3. *L. pneumophila* の SBT と lag-1 gene 保有状況

本調査で浴用水とシャワー水から分離された, もしくは厚生センターで分離された *L. pneumophila* SG1 の ST と lag-1 遺伝子の保有状況について, 結果を表 4 に示した. 今年度の調査では, *L. pneumophila* SG1 は東部地域での分離が多かった (85.7%). ST については, 3 検体 (No.4,5,6) から分離された ST502 以外は多様であった. この ST502 が分離された浴用水を採取した浴場は地理的には離れており, その関連性は不明であった. 今年度は富山県のレジオネラ症の患者からのみ認められている<sup>7)</sup> ST505 は認められなかった. また, 14 株中 5 株で, 過去に患者喀痰から分離された株と同じ ST であった. この 5 株はいずれも lag-1 遺伝子陽性であった. この 5 株以外に 2 株が lag-1 遺伝子を保有し, 全体で 7 株 (50.0%) が保有していた. 浴用水における lag-1 遺伝子を保有する *L. pneumophila* SG1 の検出状況について, 2011 年からの 5 年間についてまとめた (表 5). これを施設数で見ると, *Legionella* 属菌が検出された 36 施設のうち 21 施設 (58.3%) で *L. pneumophila* SG1 が検出され, さらにその 42.9% にあたる 9 施設で lag-1 遺伝子保有株が検出された. これを検体 (浴用水) でみると, *Legionella* 属菌が検出された 71 検体のうち, 42 検体 (59.2%) から *L. pneumophila* SG1 が検出され, その 33.3% (14 検体) は lag-1 遺伝子を保有した.

### D. 考察

レジオネラ症患者の感染源のひとつと指摘された<sup>1)</sup> 公衆浴場のシャワー水に注目し、本研究の中で平成 24 年から *Legionella* 属菌による汚染実態を調査してきたが、本年の検出率 19.4%はこの 4 年間の中で最も低かった。これは、この 3 年間に行ったシャワー水の検査の結果<sup>8)</sup> がシャワー水の衛生管理の必要性を示すものであったため、監視指導が徹底されるようになったことが効を奏したものと考えられよう。シャワー水はミスト発生が多くリスクの高い環境水であることから、今後も重点的な監視が必要である。シャワー水の *Legionella* 属菌による汚染状況について、他県の報告がほとんどないことから、これらの調査結果が富山県の患者発生にどのように関連するかは現時点では明らかではない。シャワー水の衛生管理指導の指標とするため、また、患者発生状況との関連性を解析するためにも、汚染実態を統一した方法で把握することが必要であり、検体数と選び方、採水の方法など、効率的な調査方法が示されることを強く望む。

本研究では、レジオネラ症の新しい感染源を探すため、患者発生地域付近の河川水や土壌を調査してきたが、今年度は対照的に患者発生地域とは関係なく、富山市内の市街地を流れる市中河川水について調査した。*Legionella* 属菌の検出率は昨年までのそれと同様であったが、昨年までと異なり、市中河川からは *L. pneumophila* SG1 は分離されなかった。河川水や土壌が周辺の浴用施設等を汚染し、レジオネラ症の感染源として関与するかについて解析するには、市中河川水の調査数をさらに増やして検討する必要があると思われる。

患者喀痰から分離される *Legionella* 属菌の多くは *L. pneumophila* SG1 であり、かつ *lag-1* 遺伝子を保有する<sup>6)</sup>。データは示さ

ないが、富山県のレジオネラ症患者喀痰から分離された 51 株においても 2 株を除きすべてが *lag-1* 遺伝子を保有していた (96.1%)。これらのデータから、浴用水における *lag-1* 遺伝子を保有する本菌の検出率もしくは汚染数が、患者の発生とより関連するものと推測される。本調査での浴用水、シャワー水における *lag-1* 遺伝子保有 *Legionella* 属菌の分離率は、検体数で 33.3%、施設数で 42.9%であったが、同様の調査を依頼した他の 1 県では、浴用水から *lag-1* 遺伝子保有株は 1 株も分離されなかった。この結果が、富山県でのレジオネラ症患者報告数が多いことと関連するかについては、さらに検討する必要がある。加えて、患者発生後の感染源調査（積極的疫学調査などの行政検査）では *Legionella* 属菌による汚染状況の把握に加え、*lag-1* 遺伝子を保有する本菌を探求することが重要になると思われる。

富山県におけるレジオネラ症の報告数は平成 20 年以降、年間 20~30 名で推移していたが、平成 27 年はついに 40 名の届け出となった。本疾患については、依然として多くの事例で感染源が特定されないのが現状である。富山県での患者への聞き取りなどによる行動調査で浴用水の関連が強く疑われる事例がおよそ 4 割となっているが、この 4 割の患者でさえも、喀痰と浴用水の両方から同一の ST を示す *Legionella* 属菌が分離され、分子疫学的に感染源が証明された事例は極めて少ない。その理由として、一つは患者の多くは尿中抗原検査で診断され、喀痰培養試験により *Legionella* 属菌が分離されることは少なく、菌の分子疫学的解析等ができないことが挙げられる。しかしながら、理由はそれだけではなく、浴用水から患者と同一の ST である *Legionella* 属菌を選択的に分離することが困難である

ことも考えられる。とりわけ、調査前に浴用水が塩素消毒された場合、汚染菌数がそれほど多くない場合などには菌の分離は困難となる。もしくは、感染源は浴用施設ではなく、まったく別に存在する場合もあるのかも知れない。*Legionella* 属菌は環境から広く分離され、ある一つの ST の *Legionella* 属菌が複数の地点あるいは浴用水から分離されることはしばしば見られることである。したがって、感染源を特定する際に、患者と感染源から分離された株の ST の一致は絶対条件とはならないが、間違いなく必要条件となる。近年、喀痰から直接 DNA を抽出し、SBT 等により、感染した *Legionella* 属菌がどのような環境に棲息していたかを類推することが可能になっている<sup>9,10</sup>。今後はこのような手技を活用して、感染源を探求する必要がある。そのためには、まずは喀痰の確保が必要である。そして、環境検体からは、*L. pneumophila* SG1 を選択的に分離することが必要であろう。

#### 結語

富山県におけるレジオネラ症発生が多い理由として、調査結果は直接的な関連性を示さなかったが、患者から分離された *lag-1* 保有 *L. pneumophila* SG1 に注目すると、他の1県と比べ高い検出率であったことから、この点に注目した調査が必要であることが示された。

また、感染源を特定するために、*lag-1* を保有する *L. pneumophila* SG1 を選択的に分離することが有用になると考えられることから、今後の課題として検討すべきである。

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) 国立感染症研究所厚生労働省健康局結核感染症課. 2010. シャワー水を感染源としたレジオネラ症例について.病原微生物検出情報. 31: 331-332.
- 2) 森本 洋, 磯部順子, 大屋日登美, 緒方喜久代, 中島 洋他: *Legionella* 属菌検査法の安定化に向けた取り組み: 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 *Legionella* 属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 24 年度総括・分担研究報告書 pp.93-131
- 3) 古畑 勝則 他. 2002. 土壌からの *Legionella* 属菌の分離状況. 防菌防黴誌. 30: 555-561.
- 4) 森本 洋. 2010. 分離集落の特徴を利用した *Legionella* 属菌分別法の有用性. 日本環境感染誌 25: 8-14.
- 5) Amemura-Maekawa et al., 2010. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. J. Med. Microbiol. 59: 653-659.
- 6) Kozak et al., 2009. Distribution of *lag-1* alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. J. Clin. Microbiol. 47: 2525-2535.
- 7) Kanatani et al. 2013. 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: 644–652

8) 磯部順子, 金谷潤一: 富山県の不明感染源解明のための環境調査: 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 pp.123-132.

9) Amemura-Maekawa et al., 2012. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 4263–4270.

10) M. Mentasti, et al. 2012. Application of *Legionella pneumophila*-specific quantitative real-time PCR combined with direct amplification and sequence-based typing in the diagnosis and epidemiological of Legionnaires' disease. *Eur. J. Clin. Infect. Dis.* 31. 2018-2028.

#### F. 研究発表 報告

磯部順子、金谷潤一、三井千恵子、木全恵子、清水美和子、綿引正則、佐多徹太郎: 富山県における浴用水中の *Legionella* 属菌の分離状況(2014年). 富山県衛生研究所年報. 38, 61-68(2015)

#### 学会発表

Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Mitsui C, Amemura-Maekawa J, Kura F, Sata T, Watahiki M: Prevalence of *Legionella* Species in Shower Water from Public Bath Facilities in Toyama Prefecture, Japan. ESGLI 2015. London. September 2015.

Isobe J, Kanatani J, Nakagawara T, Kimata K, Mitsui C, Amemura-Maekawa J, Kura F, Sata T, Watahiki M: Case report of legionellosis with infections at two different bath facilities within a single incubation period. ESGLI 2015. London. September 2015.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

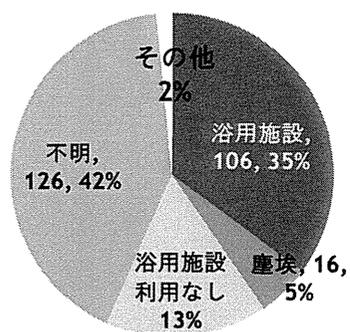


図1 レジオネラ症患者の感染源調査（推定）  
302人（1999年～2015年，富山県内）

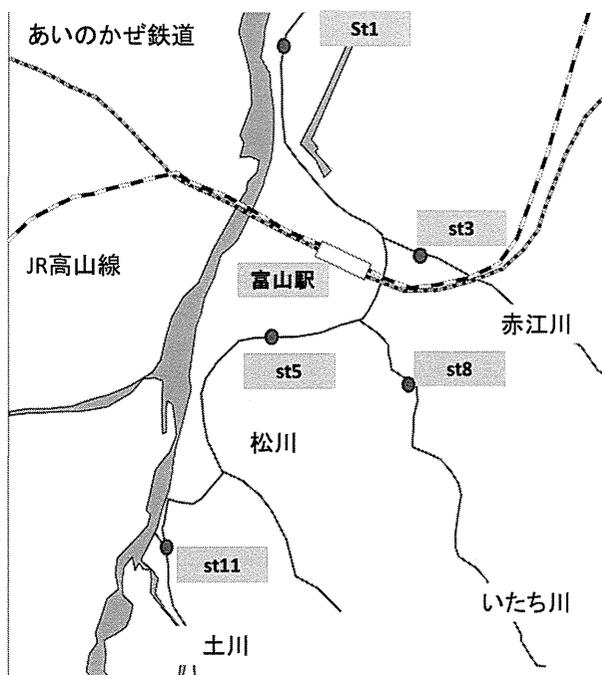


図2 河川水および土壌調査地点

表1. 浴用水における *Legionella* 属菌の検出菌数

菌数	検体数	
	浴用水	シャワー水
10未満	37	29
10-99	10	3
100-999	2	4
>1000	2	0
合計	51	36

表2. 2015年に分離および収集した環境由来 *L. pneumophila* の血清群

血清型	検体数	
	浴用水	シャワー水
SG 1	3	
SG 2	2	
SG 3	2	3
SG 5	3	1
SG 6	4	2
SG 8	1	1
SG 9	2	
SG 10	1	2
SG 12	1	
SG 15	2	
UT	2	4

表 3. 河川水から分離された *Legionella* 属菌の種別

採水地点	6月		8月		12月	
	培養結果	分離された <i>Legionella</i> 属菌の血清型	培養結果	分離された <i>Legionella</i> 属菌の血清型	培養結果	分離された <i>Legionella</i> 属菌の血清型
st1	陰性		陽性	SG6*	陰性	
st3	陰性		陰性		陽性	SG6*,UT
st5	陰性		陽性	UT	陰性	
St8	陰性		陰性		陽性	SG2*
st11	陽性	SG6*,UT	陽性	SG6*	陰性	

SG: *Legionella pneumophila* serogroup

表 4. 2015 年に分離および収集した環境由来 *L. pneumophila* SG 1 の SBT

No.	分離元	地域	分離月	ST	lag-1
1	浴用水	E	Mar	1798*	+
2		E	Mar	1	-
3		W	Aug	502*	+
4		E	Aug	502*	+
5		E	Sep	502*	+
6		E	Sep	1095	-
7		E	Sep	278	-
8		E	Sep	129	-
9		E	Sep	1092	-
10		E	Sep	136	+
11	シャワー水	E	Feb	353*	+
12		W	Aug	763	-
13		E	Sep	2105	+
14		E	Sep	1	-

E ; 富山県東部地域, W;富山県西部地域

\* ; 過去に患者喀痰から分離された株の ST

表 5. 浴用水から分離された *L. pneumophila* SG1 における lag-1 遺伝子保有状況(2011-2015)

	lag-1検出		SG1検出		レジオネラ検出		全検査数	
	(施設数)	(検体数)	(施設数)	(検体数)	(施設数)	(検体数)	(施設数)	(検体数)
2011年	2	5	5	9	8	15	14	45
2012年	2	2	3	4	9	14	15	45
2013年	2	3	4	8	7	14	13	39
2014年	2	3	5	13	6	16	11	44
2015年	1	1	4	8	6	12	13	51
	9	14	21	42	36	71	66	224

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  
地域特異的な感染源不明クラスターに関する調査(平成 27 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

平成 27 年度に県内で発生したレジオネラ症患者から分離された菌株 5 株を収集して、sequence-based typing (SBT) 法による型別を実施した。このうちの1株は *L.pneumophila* (Lp) 血清群(SG) 1 sequence type (ST) 609 で、過去にも患者 3 名から分離され、本県に地域特異性の高い菌株であった。また、Lp SG3 ST93 は国内では県内の患者9名のみから分離されている菌株であり、これらの感染源を究明するための調査を実施した。環境由来の 37 検体中 7 検体(18.9%)からレジオネラを検出し、さらに保健所が分離したレジオネラ 83 株を収集した。これらの株を含め、今まで環境から分離された Lp SG1 と SG3 について、分子疫学解析を行ったが、患者由来株と同じ ST や PFGE パターンの菌株は、検出されなかった。感染源の究明には、より多様な検体の調査や患者発生時の自宅周辺の調査も、必要であると思われる。

### A.研究目的

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 年より岡山県内のレジオネラ症患者分離株を収集し、血清群別及び遺伝子解析を行っている。また、浴槽水等環境検体のレジオネラ汚染調査を継続実施しており、患者分離株との関連を検討している。患者分離株のうち、*L.pneumophila* (以下、Lp) 血清群(以下、SG) 3<sup>1)</sup>は、すべての菌株が sequence type (以下、ST)93 で一致しており、同一菌あるいは同一の感染源による感染の可能性が示唆された。本菌は、岡山県以外では未検出であり、地域特異的なレジオネラであることが確認されている。また、患者由来の Lp SG1 の中にも、本県に地域特異性の高い菌株(ST609 及び 1077)があるため、これらの感染

源究明と県内の環境検体におけるレジオネラ汚染実態の把握を目的として、継続した調査を実施している。

本報告では、平成 27 年度の調査結果を報告する。

### B.研究方法

#### (1)材料

平成 27 年度は、県内のレジオネラ症患者から分離されたレジオネラ 5 株を、収集した。環境検体は、用水等 37 検体を採取し、レジオネラの検査を実施した。また、保健所が浴槽水等から分離したレジオネラ 83 株を収集し、同定および血清群別を実施した。このうち、Lp SG3 と同定された菌株は、過去の調査で分離された菌株と合

わせて、計 161 株について遺伝子解析を行った。

## (2)方法

環境検体のレジオネラ検査は、濾過法により 100 倍濃縮後、等量の 0.2M HCl・KCl 緩衝液 (pH2.2) で前処理を行い、GVPC 寒天培地に塗抹した。36°C で 7 日間培養し、その間に発育したコロニーを斜光法により観察して、血液寒天培地と BCYE  $\alpha$  寒天培地に接種してスクリーニングした後、血清群別 (レジオネラ免疫血清: デンカ生研) 及び PCR 法 (*mip* 遺伝子及び 5S rRNA 遺伝子) を実施し、同定した。菌株の遺伝子解析による比較は、パルスフィールド電気泳動 (以下、PFGE) 法を用いて、改良プロトコールによる 2 日間の方法<sup>2)</sup> で実施した。また、sequence-based typing (以下、SBT) 法による ST の型別と、ST を用いた minimum spanning tree (以下、MST) による解析は、国立感染症研究所で実施した。Lp SG1 株の *lag-1* 保有は、Kozak らの方法<sup>3)</sup> により、*lag-F* 及び *lag-R* のプライマーを用いて検査した。

## (倫理面への配慮)

患者株の収集・解析にあたっては、個人を特定できないように、最低限の患者情報のみを収集・表示した。

## C. 研究結果

用水等環境検体 37 検体を検査し、その結果を表 1 に示した。

レジオネラは用水 22 検体中 7 検体 (31.8%) から検出されたが、河川水、湧水、湖水、池水、土壌からは、検出されなかった。分離菌は、*L. feeleii* SG1,2、*L. hackeliae* SG1&2 及び

レジオネラ属菌 (以下、*Legionella* spp.) で、Lp は検出されなかった。

保健所が分離したレジオネラ株を収集し、血清群別を実施した結果を、表 2 に示した。収集した 83 株は、浴槽水、原水、シャワー水、ジャグジー水、冷却塔水及び風呂吐水口ふきとりから分離された。これらの菌種と血清群は、浴槽水は Lp SG1,3,5,6,8,9,10、群別不能 (以下、UT)、*Legionella* spp. であった。原水は Lp SG8、シャワー水は Lp SG1,5,6、*Legionella* spp.、ジャグジー水は Lp SG3、*Legionella* spp.、冷却塔水は Lp SG1,5,10,13,UT、*L. anisa*、*L. feeleii* SG1、*Legionella* spp.、風呂吐水口ふきとりは Lp SG1 であった。

現在までに収集したレジオネラ症患者から分離された株を、表 3 に示した。

平成 27 年度は Lp SG1 が 4 株、*L. longbeachae* SG2 が 1 株で、過去 9 年間に収集した合計株数は 38 株になり、本年度初めて Lp 以外の *L. longbeachae* が分離された。Lp の血清群は、4 株すべてが SG1 で、38 株中 Lp SG1 が 24 株となった。このうち、19 株について *lag-1* の保有を検査した結果、16 株 (84.2%) が保有し高い保有率を示したが、保有していなかった株でも、患者は呼吸困難や意識障害などの厳しい症状を呈していた。

患者由来株の SBT 法による解析結果は、Lp SG1 が多様な ST に型別されたのに対し、Lp SG3 は 9 株すべてが同じ ST93 で、さらに PFGE 法による遺伝子パターンも同一であった。Lp SG1 (ST609、ST1077) 及び Lp SG3 (ST93) の各菌株は、国内では本県に地

域特異的に分離されており、本年度も Lp SG1 ST609 が 1 株分離された。

Lp SG1 について感染研で実施した 751 株の MST 解析の結果を、図 1 に示した。患者由来の Lp SG 1(ST609)は、感染源不明の臨床分離株が多い Group-U に属し、これまで報告された 6 例のうち、4 例が本県の患者由来株であった。これらの事例では、1 例の県外の温泉推定例以外は、感染源が不明である。

一方、患者由来の Lp SG3(ST93)と、環境から検出されたすべての Lp SG3 について、PFGE 法を用いた遺伝子解析を行い比較した。その結果は、表 4 及び図 2 に示した。浴槽水等由来株 161 株の PFGE パターンは 75 パターンに分類されたが、患者由来株の遺伝子パターンと一致する株は無かった。SBT 法に必要な 7 つの遺伝子のうち、flaA だけの塩基配列について、昨年度実施した MST による解析結果でも、ST93 株は flaA3 のグループに属していたが、clonal complex は形成しなかった。

#### D. 考察

当センターがレジオネラレファレンスセンター活動の一環で平成 19 年より収集してきた患者由来株は 38 株となり、その多くは Lp SG1 と SG3 が占めた。このうち、Lp SG1(ST609 及び ST1077)と Lp SG3(ST93)は、いずれも本県に地域特異的に検出された菌株で、これらの感染源究明に向けて、環境水等の調査を実施してきた。しかしながら、現在までのところ、感染源の究明には至って

いない。Lp SG3 については、患者由来株 9 株すべてが ST93 で同じ PFGE パターンを示したが、患者の住所や感染時期は異なっており、疫学的な共通性も見られなかったことから、本菌が広範囲に多様な検体を汚染している可能性が、危惧された。今まで実施した浴槽水の調査では、県下の広範囲な地域の施設で採水した多数の検体からレジオネラを分離し、併せて保健所等で分離された菌株も収集して、このうちの Lp SG3 株計 161 株について、遺伝子解析を実施した。しかし、患者と同一の株は見つからなかったことから、浴槽水における本菌の汚染は、かなり低いものと思われた。Lp SG1(ST609 及び ST1077)についても、現在までの解析結果では、Lp SG3(ST93)と同様に、同じ ST の株は環境検体から検出されていない。このことから、本年度当初、これらの菌株の感染源究明のためには、今まであまり検査をしていない噴水や人口滝などの修景水等についても、積極的な調査が必要と考えていた。MST 解析の結果でも、ST609 は感染源不明の Group-U に属し、浴槽水や冷却塔水等に広く分布している ST の菌株とは、異なっていた。しかしながら、実際の調査の実施に際しては、各施設や設備ごとに管理者が異なっているため、それぞれ個別に許可が必要で、加えて許可の可否も依頼してみなければ不明であることから、調査は実施できなかった。ところが、2015 年 12 月にスペインでバス停近くの噴水からレジオネラが検出され、多数のレジオネラ症患者を出す事例が発生した。このことから、修景水等の衛生管理の重要性が改めて示唆され、今後これらの汚染実態を把握するための行政的な対応が、必要であると思われた。一方、本年度実施した Lp

SG1の *lag-1* 保有については、調査した患者由来の 19 株中 16 株(84.2%)が保有していた。*lag-1* については病原性との関連が指摘されており、調査の結果でも高率に保有していたが、*lag-1* を保有していなかった菌株が分離された患者でも、その症状が比較的重篤な場合も見られることから、より多くの事例についての検討が必要であると思われた。

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河口豊先生に、深謝いたします。

#### E. 結論

- 1) 平成 27 年度に、県内で発生したレジオネラ症の患者由来株 5 株を収集した。これらは Lp SG1 株 4 株と、*L. longbeachae* SG2 株 1 株であった。
- 2) このうち LpSG1(ST609)は、過去にも本県の患者から分離されている地域特異性の高い株で、MST 解析では感染源不明の臨床分離株が多い Group-U に属した。
- 3) 本年度、分離・収集した株のうち、Lp SG1 及び SG3 について遺伝子解析を行ったが、

本県に地域特異的な患者由来株と同じ ST 及び PFGE パターンの株は見つからなかった。

#### F. 参考文献

- 1) 西山 明宏、石田 直、興梠 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.
- 3) Kozak N.A., Benson R.F., Brown E., et al. : Distribution of *lag-1* Alleles and Sequence-Based Types among *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Clinical and Environmental Isolates in the United States. J. Clin.Microbiol. 2009;47(8):2525-2535.

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 検体別レジオネラ検出状況(平成 27 年度)

検体名	検体数	検出数	検出率 (%)	検出菌種*
用水	22	7	31.8	<i>L. feeleii</i> SG 1,2、 <i>L. hackeliae</i> SG 1&2、 <i>Legionella</i> spp.
河川水	8	0	0	
湧水	3	0	0	
湖水	1	0	0	
池水	1	0	0	
土壌	2	0	0	
計	37	7	18.9	

\*:重複を含む

表2 保健所等分離レジオネラ株(平成 27 年度)

検体名	菌株数	検出菌種及び血清群
浴槽水	53	<i>L.pneumophila</i> SG 1,3,5,6,8,9,10,UT、 <i>Legionella</i> spp.
原水	1	<i>L.pneumophila</i> SG 8
シャワー水	5	<i>L.pneumophila</i> SG 1,5,6、 <i>Legionella</i> spp.
ジャグジー水	3	<i>L.pneumophila</i> SG 3、 <i>Legionella</i> spp.
冷却塔水	20	<i>L.pneumophila</i> SG 1,5,10,13,UT、 <i>L. anisa</i> 、 <i>L. feeleii</i> SG 1、 <i>Legionella</i> spp.
風呂吐水口ふきとり	1	<i>L.pneumophila</i> SG 1
計	83	

UT:O 血清群別不能

表3 県内で発生したレジオネラ症患者分離株(平成 19 年~27 年)

菌株No	分離年	菌種	血清群	ST	PFGE パターン	年齢	性別	検体	症状					その他	lag-1 保有	
									発熱	咳嗽	呼吸困難	意識障害	肺炎			
K9	2007	Lp	1	595		64	男	喀痰	●	●	●	●	●			-
K11	2007	Lp	1	593		69	男	喀痰	●	●	●	●	●			-
K105	2008	Lp	1	609		59	男	喀痰	●	●	●	●	●	頭痛		+
K117	2008	Lp	1	609		79	男	喀痰	●	●	●	●	●			+
K118	2008	Lp	1	594		55	男	喀痰	●	●	●	●	●			+
K090729	2009	Lp	1	550		37	男	喀痰	●	●	●	●	●	下痢		+
O100216	2009	Lp	1	23		54	男	喀痰	●	●	●	●	●			+
K100118	2010	Lp	1	609		58	男	喀痰	●	●	●	●	●			+
K100503	2010	Lp	1	42		69	男	喀痰	●	●	●	●	●			+
K110728	2011	Lp	1	1077		55	女	喀痰	●	●	●	●	●	胸部異常影 糖尿病あり		+
K111019	2011	Lp	1	120		78	男	喀痰	●	●	●	●	●			+
KD111109	2011	Lp	1	120		78	男	喀痰	●	●	●	●	●	腹痛、多臓器不全		+
K111117	2011	Lp	1	1077		91	男	喀痰	●	●	●	●	●			
K111213	2011	Lp	1	1077		69	男	喀痰	●	●	●	●	●			
K120214	2012	Lp	1	42		55	男	喀痰	●	●	●	●	●			
K121108	2012	Lp	1	530		71	男	喀痰	●	●	●	●	●	EUに入院		-
K140624	2014	Lp	1	1847		50	男	喀痰	●	●	●	●	●	下痢		+
K140618	2014	Lp	1	1845		53	男	喀痰	●	●	●	●	●	多臓器不全		+
K140714	2014	Lp	1	23		68	男	喀痰	●	●	●	●	●	筋肉痛、全身倦怠感、下痢		+
K140904	2014	Lp	1	1846		49	男	喀痰	●	●	●	●	●	肝障害、腎不全		+
K150622	2015	Lp	1	1		57	男	喀痰	●	●	●	●	●	下痢、全身倦怠感		+
K150925	2015	Lp	1	609		94	男	喀痰	●	●	●	●	●			+
K150823	2015	Lp	1	2126		70	男	喀痰	●	●	●	●	●	多臓器不全		+
K151014	2015	Lp	1	642		61	男	喀痰	●	●	●	●	●	多臓器不全		+
KD110625	2011	Lp	2	354		63	男	喀痰	●	●	●	●	●	肺炎から死亡 糖尿病あり		
K79	2008	Lp	3	93		66	男	喀痰	●	●	●	●	●			
K86	2008	Lp	3	93		58	女	喀痰						胸部異常影、症状無し		
K95	2008	Lp	3	93		79	男	喀痰						胸部異常影、症状無し		
K100423	2010	Lp	3	93		60	女	肺胞洗浄液	●	●	●	●	●			
K100712	2010	Lp	3	93		74	男	喀痰	●	●	●	●	●			
K110707	2011	Lp	3	93		77	男	喀痰						胸部異常影、症状無し		
K110908	2011	Lp	3	93		59	女	喀痰						胸部異常影、症状無し		
K120831	2012	Lp	3	93		58	女	喀痰						胸部異常影、非定型肺炎疑い		
K130920	2013	Lp	3	93		73	男	喀痰	●	●	●	●	●			
K130108	2013	Lp	9	1283		65	男	喀痰	●	●	●	●	●	全身倦怠感		
K141112	2014	Lp	9	2094		59	男	気管内吸引痰	●	●	●	●	●			
KD120905	2012	Lp	10	1427		74	男	喀痰	●	●	●	●	●	EUに入院		
K151013	2015	L. bng	2	-		68	男	喀痰	●	●	●	●	●			

Lp: *L.pneumophila*, L.long: *L.longbeachae*

表4 県内で分離された *L.pneumophila* SG3 株の PFGE パターン数

由来	菌株数	バンドパターン
浴槽水	113	63
原湯	4	4
ジャグジー水	9	7
プール水	8	4
プールろ過水	1	1
フローミル水	9	1
ろ過水	4	1
冷却水	3	3
シャワー水	1	1
患者	9	1
	161	76

\*検体間の重複を含む

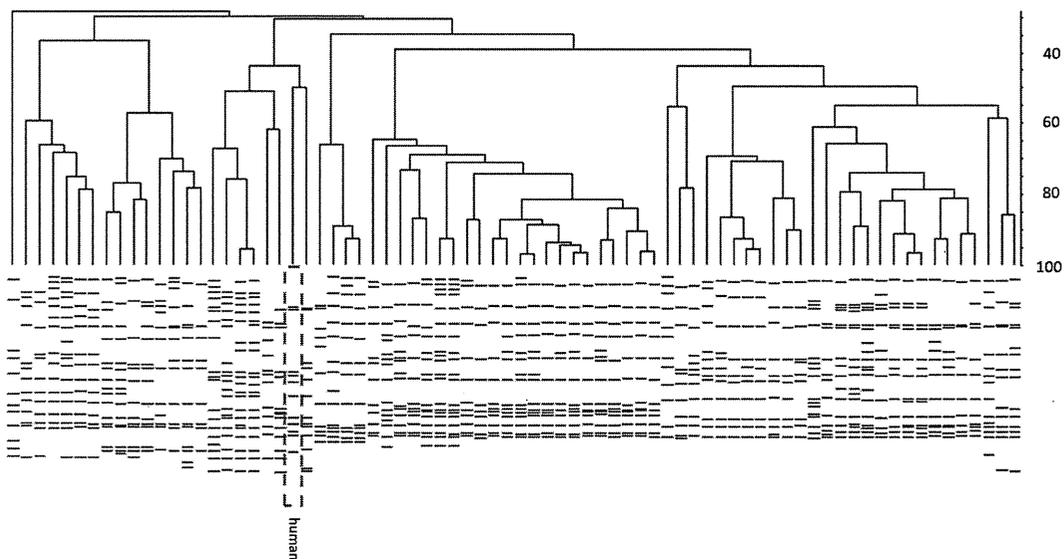


図2 患者および浴槽水等由来 *L.pneumophila* SG3 株の PFGE パターンとデンドログラム解析結果

# *L. pneumophila* 血清群1 (751株) の minimum spanning tree 図

当該菌株の位置を示した。

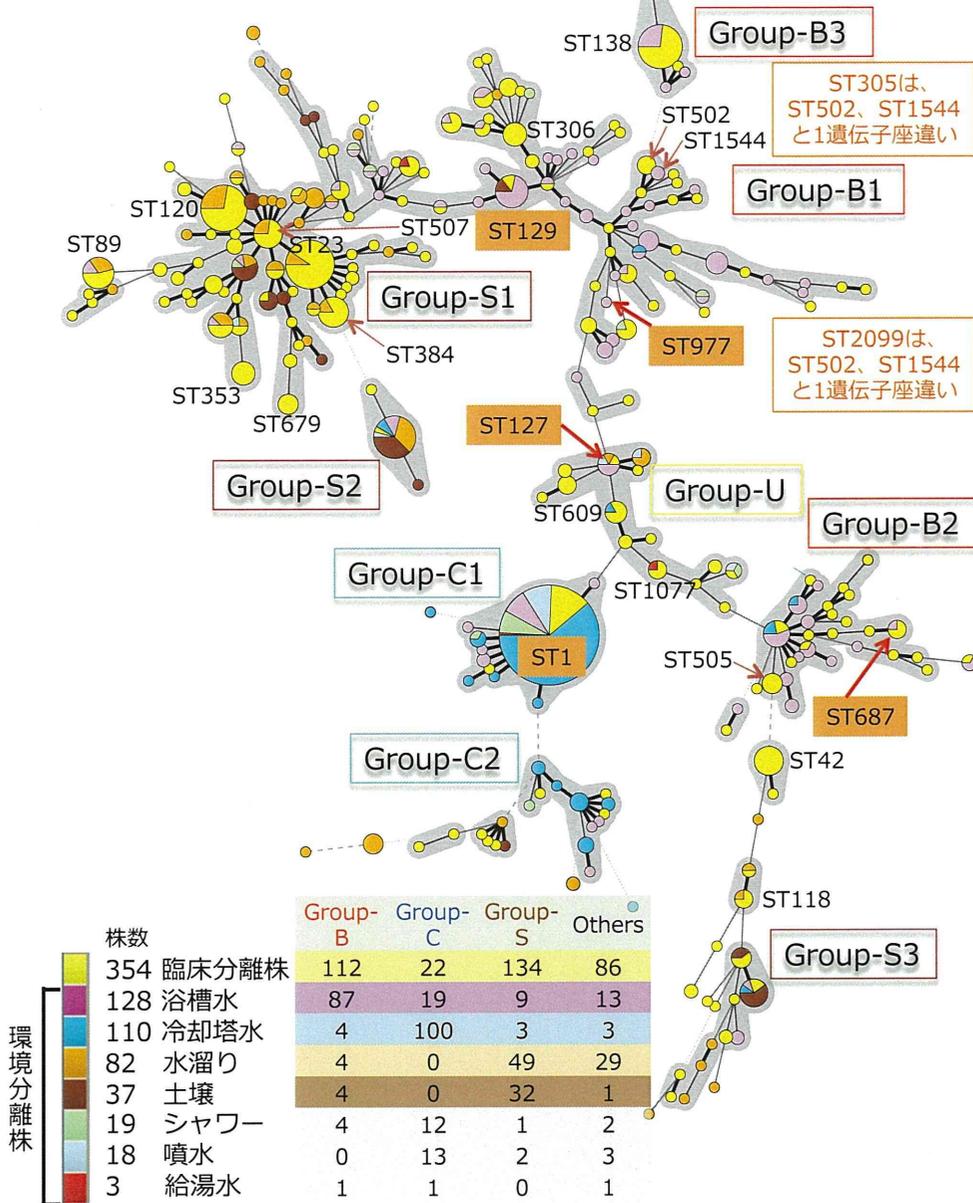


図 1 *L. pneumophila* 血清群 1 (751 株) の minimum spanning tree (感染研:前川純子先生)

平成 27 年度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」  
分担研究報告書

「入浴施設等における *Legionella* 汚染の実態に関する研究」

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	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所微生物部
研究分担者	前川純子	国立感染症研究所細菌第一部
研究協力者	大屋日登美	神奈川県衛生研究所微生物部
研究協力者	鈴木美雪	神奈川県衛生研究所微生物部

研究要旨

平成 27 年度は、浴槽と付随設備、給水系のレジオネラ汚染の実態を把握するために、神奈川県内の 3 ヶ所の入浴施設と 3 医療機関を対象に調査を実施した。入浴施設は循環装置の有無並びに塩素消毒の有無から該当施設を選び、調査の協力を得た。循環装置を設置し、塩素消毒を実施している入浴施設では、浴槽からレジオネラ属菌は検出されなかったが、レジオネラ DNA 及びレジオネラ属菌が蛇口及びシャワーからの水試料（47.1%及び 29.4%）とスワブ試料（30.8%及び 7.7%）から検出された。循環装置は設置していないが塩素消毒を行っている入浴施設では、浴槽水 1 検体と浴槽壁のスワブ試料 1 検体からレジオネラ属菌が検出され、浴槽の洗浄が不十分であると推測された。循環装置を設置せず塩素消毒を実施していない入浴施設は限られた利用日にもみ浴槽に湯を張り、そのつど清掃していたため、レジオネラの汚染は少なく、蛇口水とシャワー水からレジオネラ DNA が検出されたただけであった。医療機関は浴室と個室や共用スペースの洗面台、受水槽等の給水系を調査対象とし、医療機関により汚染の程度は異なっていた。1 医療機関ではレジオネラ DNA とレジオネラ属菌の水試料での検出率はそれぞれ 6.7%及び 26.7%と汚染が少なく、2 医療機関ではそれぞれ 93.8%と 37.5%及び 60.0%と 66.7%からレジオネラ DNA とレジオネラ属菌が検出された。給水系に対するレジオネラ汚染防止対策が強く求められる結果となった。

A. 研究目的

レジオネラ属菌は冷却塔、入浴施設、給水施設等の水環境に生息し、レジオネラ感染症の原因となる。レジオネラ感染症は、レジオネラ属菌が含まれた、菌が生息する

水環境に由来する微小水滴を吸入することで発生する。わが国では年間 1,000 例ほどの症例が報告されており、散発事例が多くを占め、その原因は大半が入浴施設の利用であることが知られている。したがって、

わが国のレジオネラ症の患者数を減少させるには、入浴施設におけるレジオネラ対策を強化することが重要である。

本調査は、入浴施設におけるレジオネラ対策を策定するための基礎的情報となる実態の把握を行うことを目的として実施した。調査の対象は入浴施設ならびに医療機関の入浴設備、さらに入浴設備に関連する給水・給湯設備とした。

## B. 研究方法

### 1) 試料の採取

調査は入浴施設と医療機関において実施した。調査の試料は水試料およびスワブ試料とした。入浴施設では浴槽水、湯口水、蛇口水、シャワー水を水試料として採取し、浴槽壁、蛇口の内側、シャワーヘッドの内側からスワブ試料を採取した。医療機関では浴槽の湯口水、シャワー水、浴室や洗面台等の蛇口水、受水槽水を水試料として採取し、蛇口の内側及びシャワーヘッドの内側からスワブ試料を採取した。水試料は25%チオ硫酸ナトリウム 1.0ml を添加した滅菌容器に原則として 500ml を採取した。シャワーや蛇口からの水は放水直後に採取した。水試料は温度を採取時に、pH を実験室に搬入時に測定した。遊離残留塩素濃度は DPD 法によりハンディ水質計“アクアブ” AQ-101 型 (柴田科学) を用いて実験室に搬入時に測定した。水試料の ATP 値の測定は、実験室に搬入後、ルシパック - Pen Aqua (キッコーマン) を用い、ルミテスター PD-20 (キッコーマン) により行った。スワブ試料は、滅菌綿棒で採取部位を拭って採取し、滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.2) を滅菌水で 50 倍に希釈した液 (50 倍希釈 PBS) 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、搬入当日に実施する検査まで冷蔵保存した。

### 2) *Legionella* 属菌の分離

水試料は直径 47mm、孔径 0.2 $\mu$ m のポリカーボネートメンブランフィルターでろ過し、5ml の 50 倍希釈 PBS で再浮遊した。スワブ試料は 50 倍希釈 PBS を加えて 5ml とし、十分に攪拌して試料を浮遊させた。試料の浮遊液は 0.5ml を 50 $^{\circ}$ C、20 分の加熱処理を行った。別の 0.5ml に同量の pH2.2 緩衝液を加え、4 分間酸処理した。未処理の試料及び処理後の浮遊液を 50 倍希釈 PBS で 10 倍希釈し、原液と 10 倍および 100 倍希釈液の各 100 $\mu$ l を MWY 寒天平板培地 (Oxoid) 及び GVPC 寒天平板培地 (日研生物医学研究所) に塗抹し、36 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。*Legionella* 属菌を疑う集落を BCYE  $\alpha$  寒天平板培地 (Oxoid) に転培し、性状により鑑別を行った。

### 3) LAMP 法による *Legionella* 属菌遺伝子の検出

LAMP 法による *Legionella* 属菌遺伝子の検出は、Loopamp レジオネラ検出試薬キット E (栄研化学) により行った。水試料を 5ml に濃縮した試料およびスワブ試料を 50 倍希釈 PBS に浮遊させた試料に対して、キット添付の説明書に従って実施した。

### 4) *Legionella* 属菌の同定

調査試料から分離された *Legionella* 属菌は、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* 属菌と *L. pneumophila* であることを決定した。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。

#### 5) 従属栄養細菌数

水試料を 50 倍希釈 PBS で 10 倍段階希釈し、原液及び各段階の試料の 1.0ml を R2A 寒天培地 (BD) に接種し、混釈培養法により 25°C で 7 日間培養した。培養後、集落数を計数した。

### C. 研究結果及び考察

#### 1) 入浴施設

神奈川県内の 3 か所の入浴施設 (A、B、C) において調査を実施した。入浴施設での試料の採取は平成 27 年 10 月 19 日から平成 27 年 11 月 17 日に行った。

施設 A は循環式入浴施設で消毒装置が設置されていた。施設 B は循環装置は設置せず、塩素消毒を行っていた。施設 C は小規模の施設で、循環装置を設置せず、浴槽水の塩素消毒を行っていなかったが、浴槽の使用は週に 1 回で、使用日中に排水して清掃を行っていた。

施設 A では、浴槽水、湯口水、蛇口水、シャワー水を 17 検体採取し、温度は平均 38.7°C、範囲は 24.1~43.9°C、pH は平均 8.0、範囲は 7.1~8.2°C、残留塩素濃度は平均 0.58mg/L、範囲は 0.02~5.4mg/L、ATP 値は幾何平均 9.4RLU、範囲は 0~52RLU、従属栄養細菌数は幾何平均 400CFU/ml、範囲は 60~5,000CFU/ml であった。スワブ検体は湯口、蛇口、シャワーヘッドの内側から 13 検体採取した。

施設 B では、浴槽水、蛇口水、シャワー水を 10 検体採取し、温度は平均 26.6°C、範囲は 21.7~39.0°C、pH は平均 7.8、範囲は 7.5~8.7、残留塩素濃度は平均 0.3mg/L、

範囲は 0~1.45mg/L、ATP 値は幾何平均 4.8RLU、範囲は 2~50RLU、従属栄養細菌数は幾何平均 1,386CFU/ml、範囲は 340~2,390CFU/ml であった。スワブ検体は浴槽壁と蛇口及びシャワーヘッドの内側から 10 検体を採取した。

施設 C では湯口水、蛇口水、シャワー水を 10 検体採取し、温度は平均 23.1°C、範囲は 20.5~32.0、pH は平均 8.0、範囲は 7.6~8.1、遊離残留塩素濃度は平均 0.025mg/L、範囲は 0.02~0.05mg/L、ATP 値は幾何平均が 12.5RLU、範囲が 7~28RLU であった。この施設では従属栄養細菌数は測定しなかった。スワブ検体は湯口、蛇口、シャワーヘッドの内側から 10 検体を採取した。

施設 A では、水試料 17 検体中 8 検体 (47.1%)、スワブ検体 13 検体中 4 検体 (30.8%) からレジオネラ DNA が検出され、それぞれ 5 検体 (29.4%) 及び 1 検体 (7.7%) から菌が検出された (表 1)。この施設では浴槽水の残留塩素濃度が高く、レジオネラ DNA 及びレジオネラ属菌は検出されなかったが、湯口水と蛇口水、シャワー水からレジオネラ DNA あるいはレジオネラ属菌が検出された。加温や消毒、流水 (flushing) による管理の必要性が示唆された。

施設 B では、水試料 10 検体中 4 検体 (40.0%)、スワブ検体 10 検体中 1 検体 (10.0%) からレジオネラ DNA が検出され、10CFU/100ml と少数ではあるが浴槽水 1 検体 (10.0%) 及び浴槽壁のスワブ 1 検体 (10.0%) から菌が検出された (表 1)。この施設では男湯の浴槽水の残留塩素濃度が 1.45mg/L であるにもかかわらずレジオネラ属菌が検出された。女湯の浴槽水の残留塩素濃度が 0.49mg/L であったがレジオ