

培養結果の概要を Table 1 に示した。160 検体中 77 検体 (48%) 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 53 検体中 32 検体 (60%)、湯口水 51 検体中 20 検体 (39%) で、「循環式施設」では浴槽水 29 検体中 11 検体 (38%)、湯口水 27 検体中 14 検体 (52%) 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 25 施設であった。浴槽水 (+) 湯口水 (-) となった施設は 13 施設、浴槽水 (-) 湯口水 (+) となった施設は 8 施設であった (Table 2)。

レジオネラ属菌が検出された 77 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 45 検体、WYO α +GVPC からの分離が 4 検体、WYO α +MWY からの分離が 3 検体、GVPC+MWY からの分離が 5 検体、WYO α のみからの分離が 2 検体、GVPC のみからの分離が 3 検体、MWY のみから分離が 5 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 53 検体、WYO α +MWY からの分離が 2 検体、GVPC+MWY からの分離が 3 検体、WYO α のみからの分離が 4 検体、GVPC のみからの分離が 7 検体、MWY のみから分離が 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 77 検体のうち 71 検体は斜光法で確認することができたが、6 検体は継続培養後にレジオネラ属菌が確認された。継続培養で陽性となった 6 検体から分離されたレジオネラ属菌は、4 検体は *L. pneumophila*、1 検体は *L. quinlivanii*、1 検体は *L. micdadei* であった。

2. 加熱時間の検討

加熱による雑菌処理時間について検討した結果を Fig.2 に示した。雑菌が多い検体は、20 分加熱に比べ 30 分加熱が有効との結果が得られたが、30 分加熱することにより、

検出できない検体が 5 検体あった。(Fig.2, Table 4)

3. 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。13 検体が培養 (+) LAMP (-) の不一致の結果となった (Table 5)。13 検体のうち 5 検体は、培養菌数が 5cfu/100ml で 10cfu/100ml 未満であった。残り 8 検体中 6 検体は 20cfu/100ml から 50cfu/100ml、2 検体はそれぞれ 150cfu/100ml、500cfu/100ml のレジオネラ属菌が検出された。

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、LAMP に対して阻害がかかる検水が存在した。

4. 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。

5. 研修に関する検討

民間企業主導の研修については、関東化学株式会社の協力を得て、平成25年8月23日(金)久留米大学医学部実習室にて、九州地区の民間検査機関を対象に実施した。参加機関は15施設、参加人数は22名であった。関東化学による事前アンケートでは、レジオネラ検査経験年数は十数年から数ヶ月と幅が大きく、比較的経験年数が少ない傾向があった。研修終了後のアンケート結果では、研修日程、開催場所、内容についての評価は高かった。しかし、斜光法に用いる実体顕微鏡が1台しか用意できなかったため、観察時間に制約が生じ、やや消化不良であったというような感想も寄せられた。

行政主導の研修については、富山県衛生研究所が実施主体となり、平成25年9月27日(金)富山県衛生研究所において実施した。

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日目ま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77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54検体

から63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67検体から、加熱処理では71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。

加熱による雑菌処理時間において、雑菌が多い検体は20分間加熱に比べ30分間加熱が有効との結果が得られた。しかし、30分間加熱することにより、検出できない検体も多々あり、このことから、加熱による雑菌処理には20分間加熱が適当と考えられる。雑菌が多いと考えられる検体については、雑菌処理に酸処理を組み合わせるなどの工夫が必要と考える。

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。さらに、温泉検体では、「菌数」だけではなく、検出される「菌種」や泉質などの様々な要因により、LAMP法で安定した結果が得られない場合が考えられた。

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。

レジオネラ属菌の検査を実施している民間検査機関は、従来、環境検査を主とした中に、レジオネラ属菌の検査を取り入れたところも多く、食品や臨床検体の検査を主とする機関とは取り組む経緯や成り立ちが異なる場合も多い。そのような場合、食品や臨床検

体の検査を主とする機関とは異なり、微生物検査の技術を習得し、熟練した検査員が存在しない場合もある。民間検査機関への精度管理・研修の導入にあたっては、まず、レジオネラ属菌の検査実施機関の実態把握を行い、特徴・特性を熟知することが大切である。その上で、民間検査機関を含めたレジオネラ属菌検査にかかわる全ての検査機関の質の良い検査精度確保のため、精度管理事業の導入は重要な課題である。その実現のため、早期に標準的検査法：モニタリングに最適な検査法（採水時から検査結果まで）を提示し、適切な研修の場を提供し、精度管理用サンプルの安定提供および評価機関の確保を図る必要がある。

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。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. 平成 25 年度環境監視員担当者会議にて研修会を開催。
2. 平成 25 年 8 月、大分県臨床検査技師会研修会の場で講演。
3. 平成 26 年度環境監視員担当者会議にて研修会を開催。
4. 平成 27 年 3 月、大分県内の患者発生増加に伴い、感染源対策の必要性及び菌株等の確保を目的に大分県所長会へ説明を実施。
5. 平成 27 年度環境監視員担当者会議にて研修会を開催。
6. 平成 28 年 3 月、「衛生環境研究センターだより No.25」にレジオネラ症に関するトピックスを掲載。

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

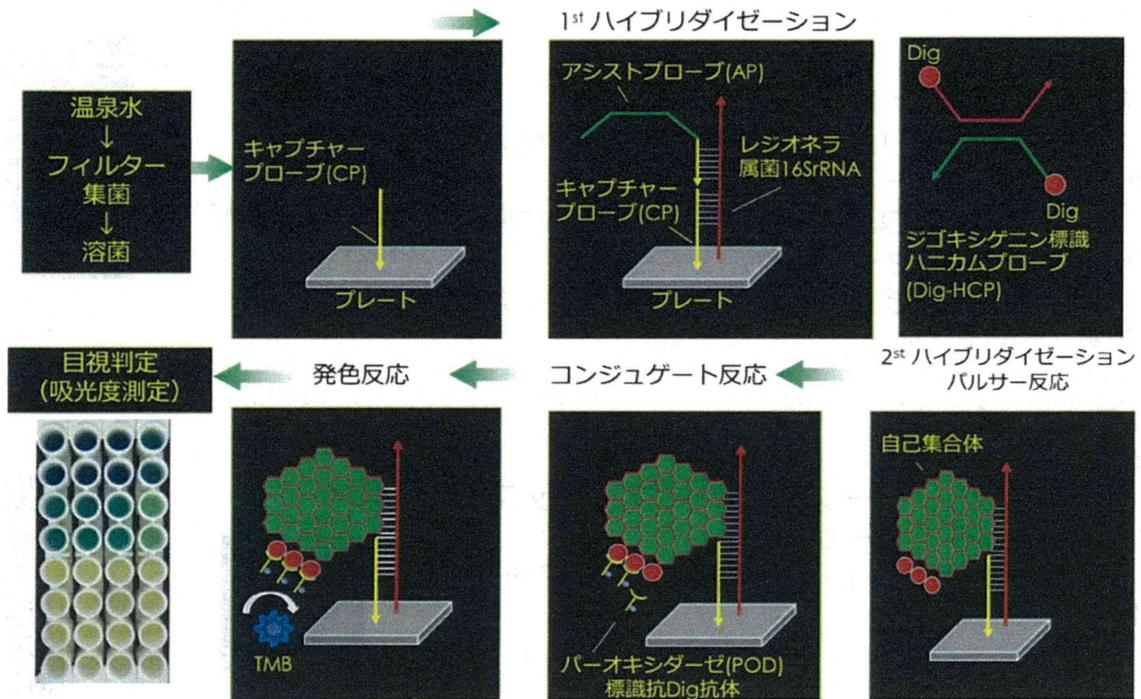


Table 1 培養法の結果

| | | 採水箇所 | 検体数 | 検出数 ^a | 検出率 |
|-------|--|------|-----|------------------|-----|
| 掛け流し式 | | 浴槽水 | 53 | 32 | 60% |
| | | 湯口水 | 51 | 20 | 39% |
| 循環式 | | 浴槽水 | 29 | 11 | 38% |
| | | 湯口水 | 27 | 14 | 52% |
| 計 | | | 160 | 77 | 48% |

10cfu/100m によらない(定性)

Table2 浴槽水と湯口水の検出状況 (n=76)

| | | 浴槽水 | | 計 |
|-----|---|-----|----|----|
| | | + | - | |
| 湯口水 | + | 25 | 8 | 33 |
| | - | 13 | 30 | 43 |
| 計 | | 38 | 38 | 76 |

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=160)

| | | | 未加熱 | 加熱 |
|-----|------|-----|-----|----|
| WYO | GVPC | MWY | 45 | 53 |
| WYO | GVPC | | 4 | 0 |
| WYO | | MWY | 3 | 2 |
| | GVPC | MWY | 5 | 3 |
| WYO | | | 2 | 4 |
| | GVPC | | 3 | 7 |
| | | MWY | 5 | 2 |
| 計 | | | 67 | 71 |

Table 3-1 雑菌処理と分離培地の検出感度 (n=160)

| | 未加熱 | 加熱 |
|-----------|-----|----|
| WYOα(市販品) | 54 | 59 |
| GVPC(市販品) | 57 | 63 |
| MWY(自家製) | 58 | 59 |

10cfu/100m によらない(定性)

Fig.2 加熱時間と菌の検出状況 (n=56)

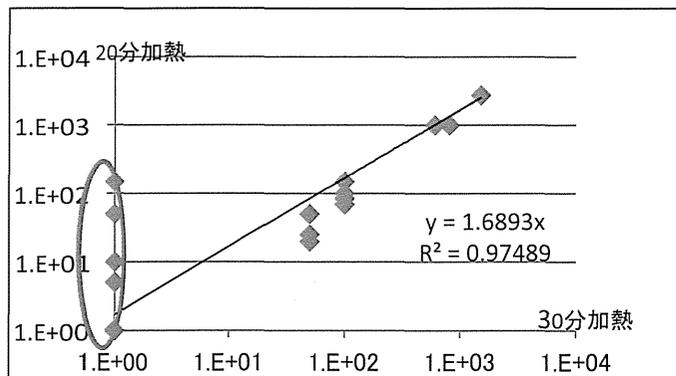


Table 4 加熱時間と検出菌数

| 菌数 | 検体数* | 20分** | 30分*** |
|---------|------|-------|--------|
| 10未満 | 38 | 41 | 46 |
| 10-99 | 10 | 9 | 3 |
| 100-999 | 5 | 3 | 6 |
| 1000以上 | 3 | 3 | 1 |
| | 56 | 56 | 56 |

* 加熱、未加熱によらず 10cfu/100ml 以上検出された検体数

** 20分加熱により 10cfu/100ml 以上検出された検体数

*** 30分加熱により 10cfu/100ml 以上検出された検体数

Table 5 LAMP 法と培養法の比較 (n=160)

| | LAMP | | 計 | |
|-----|------|----|----|-----|
| | + | - | | |
| 培養法 | + | 64 | 13 | 77 |
| | - | 28 | 55 | 83 |
| 計 | | 92 | 68 | 160 |

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)

様

平成25年6月吉日

関東化学株式会社
福岡支店

レジオネラ実技研修会のご案内

拝啓 貴社ますますご清栄のこととお慶び申し上げます。
平素は格別のお引き立てを賜り、厚く御礼申し上げます。

厚生労働科学研究費補助金による「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班」様と久留米大学病院様に御協力をいただき、レジオネラ検査における培養時間の短縮、検査精度の向上を目指し、斜光法の普及を目的とした民間検査企業様向けの研修会を企画致しました。

検査を行っている方で、上記「レジオネラ研究班」が推奨している培養検査法(斜光法)を学習してみたいという方を対象に、検査の流れを体験していただきます。皆様の御参加を心よりお待ちしております。

敬具

記

日時 平成25年8月23日(金) 13:00~17:00

場所 久留米大学病院(医学部基礎1号館4F実習室)
福岡県久留米市旭町67番地(JR久留米駅より徒歩10分)

※駐車場はありますが、有料となりますのでご了承ください。

スケジュール 詳細は後日ご案内致します。

- 内容 講義① レジオネラ症総論 国立感染症研究所 倉 文明先生
講義② 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
富山県衛生研究所 磯部順子先生
講義③ 斜光法を用いたレジオネラ属菌培養法のコツと注意点
北海道立衛生研究所 森本 洋先生
実習 前処理、培養、斜光法での観察等 大分県衛生環境研究センター 緒方喜久代先生

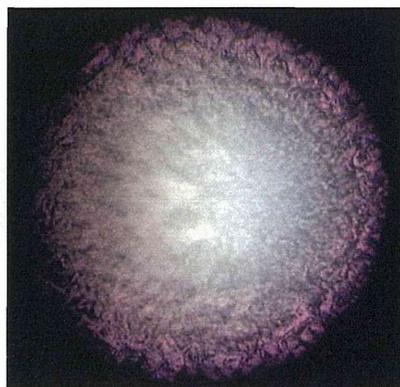
参加費 無料

お申込み方法

別紙の申し込み用紙に必要事項を明記の上、7月5日(金)までにFAXにてご返送ください。

参加人数は20名程度を予定しており、定員になり次第、締め切りと致しますのでご了承ください。

又、多数の参加ご希望が予想されますので、原則として各社1名のご参加とさせていただきます。



レジオネラ・ニューモフィラのコロニー形態(斜光法)
北海道立衛生研究所 森本 洋先生 提供



準備するもの

| ✓ | 関東化学 | ✓ | 大分県衛生環境研究センター | 備考 |
|---|---------------------|---|-----------------|---------|
| | 配布資料(テキスト)50部 | | アルコール綿 | 白衣は各自持参 |
| | 使用平板(4枚×20=80枚) | | 消毒用アルコール | |
| | コンラージ棒(4本×20=80本) | | 実体顕微鏡 | |
| | 滅菌パック(6) | | コールドライト | |
| | ディスポ手袋(L,M,S,XS) | | ミキサー(1台) | |
| | マスク | | 恒温水槽(1台) | |
| | ピペットマン(200, 1000) | | スポンジ | |
| | 専用滅菌チップ(200, 1000) | | 模擬サンプル500ml(6本) | |
| | ピペットエイド | | 滅菌水300ml(1本) | |
| | ディスポ滅菌ピペット(5, 10) | | 滅菌コニカル(6個) | |
| | 滅菌1.5mlチューブ(ロック付) | | 滅菌50mlチューブ(6本) | |
| | フィルター(0. 22または0. 2) | | ピンセット(2本) | |
| | ろ過器 | | 手拭きペーパー | |
| | ろ過装置 | | | |
| | パソコン | | | |
| | スクリーン | | | |
| | プロジェクター | | | |

斜光法用観察プレートは、森本さんに用意していただき、8月22日(木)に久留米大学に着。翌日まで、冷蔵保管していただく。
 (久留米大学保管責任者名および連絡先:)
 22日の午後3時から事前準備。

【前日】

15時00分から会場設営(関東化学+研究班員)

【当日】

12時30分 受付開始

13時00分 初めの挨拶(関東化学)、講師の先生方の紹介

13時05分 講演開始

倉先生 35分

磯部先生 30分

休憩 20分

森本先生 60分

15時30分 実習(2班に分かれて、「A」ろ過濃縮・プレート処理班と「B」顕微鏡観察班)

ろ過濃縮の実習時は、さらに3班に分かれ、ろ過・雑菌処理(酸&熱)・平板塗沫(コンラージ)の実習を行う。

16時40分 関東化学説明(10分間)

16時50分 質疑応答(10分間)

17時00分 終了

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 25-27 年度分担研究報告書

Legionella pneumophila 分離株の収集と SBT 法による遺伝子型別および解析

| | | | |
|-------|------|----------|-------|
| 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：1980 年から 2015 年までに分離された *Legionella pneumophila* 血清群 1 株（臨床分離株 354 株、環境分離株 397 株；内訳は、浴槽水由来 128 株、冷却塔水由来 110 株、水溜り由来 82 株、土壌由来 37 株、シャワー由来 19 株、噴水由来 18 株、給湯水由来 3 株）を 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 つに分かれた。レジオネラ・レファレンスセンターに送付された臨床分離株の遺伝子型がどこに位置するかという情報を地方自治体経由で医療機関に還元できるようになり、遺伝子解析が感染源の種類 の推定に寄与することが明らかとなってきた。

A. 研究目的

わが国のレジオネラ症患者の感染源の半数近くは入浴施設だと推定されている。残りのほとんどは感染現不明事例である。レジオネラ症の起因菌として最も多い *Legionella pneumophila* の遺伝子型別法と

して SBT 法が世界的に普及している。本研究では、*L. pneumophila* のわが国の臨床分離株について、SBT 法による遺伝子型別を行い、データを蓄積している。環境分離株については、起因菌として 8 割以上を占める *L. pneumophila* 血清群 1 につい

て遺伝子型別を行い、臨床分離株と環境分離株の遺伝子型を比較した。その結果、遺伝子型解析が感染源の種類に寄与することが明らかとなってきた。現時点での *L. pneumophila* 血清群 1 株の遺伝子型別結果を minimum spanning tree (MST) 法で図示して、レジオネラ・レファレンスセンターに送付された臨床分離株の遺伝子型がどこに位置するかという情報を地方自治体経由で医療機関に還元できるようになった。

B. 研究方法

レジオネラ・レファレンスセンターで収集された 1980 年から 2015 年までに分離された *L. pneumophila* 血清群 1 株 (臨床分離株 354 株、環境分離株 397 株；内訳は、浴槽水由来 128 株、冷却塔水由来 110 株、水溜り由来 82 株¹⁾、土壌由来 37 株、シャワー由来 19 株、噴水由来 18 株、給湯水由来 3 株) を 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 (ST) を決定し^{2,3)}、遺伝子型別を行った。それぞれの遺伝子型がどのグループに属するかを MST 法 (BioNumerics, Applied Maths 社) により確認した。

C. 研究結果

354 株の臨床分離株は 156 種類の遺伝子型に分かれ (表 1)、index of

discrimination (IOD)⁴⁾ は 0.981 であった。

環境分離株 397 株は、134 種類の遺伝子型に分かれた。主要な遺伝子型は ST1 (118 株)、ST48 株 (23 株)、ST129 (12 株)、ST22 (9 株) 等で、複数株で見られた遺伝子型は 52 種類あり、1 株のみの遺伝子型は、82 種類あった。IOD は 0.904 となった。

臨床分離株、環境分離株を合わせて MST 解析を行った (図 1)。MST は、浴槽水分離株あるいは浴槽水が感染源と推定・確定される臨床分離株が多く属する B1、B2、B3 の 3 つのグループ、冷却塔水分離株の多くと感染源不明の少数の臨床分離株が属する C1、C2 のグループ、土壌分・水溜り分離株のほとんどが属する S1、S2、S3 のグループ、感染源不明の臨床分離株と少数の由来が多様な環境分離株が属するグループ U の 9 つのグループに分かれた⁵⁾。S グループに属する臨床分離株は塵埃や土、あるいは浴槽水が感染源と考えられる臨床分離株、また多くの感染源不明の臨床分離株が属していた。噴水分離株は C1 に属する ST1 が 13 株 (72%) と多かったが、残りの 5 株はそれぞれ異なる ST であった (U に属するものが 3 株、S1、S2 が各 1 株)。B グループに属するものはなかった。シャワー水分離株は ST1 が 10 株 (53%) で、残りの 9 株はそれぞれ異なる ST だったが、B1 に属するものが 4 株ある点が、噴水分離株とは異なっていた。残りの 4 株は C1、C2、U、S1 が各 1 株、いずれにも属さない株が 1 株あった。

D. 考察

前研究班において、臨床分離株 217 株、環境分離株 225 株を用いて、MST 解析を行ったところ、わが国で分離された *L. pneumophila* 血清群 1 株は、遺伝子型により、B1、B2、B3、C1、C2、S1、S2、S3、U の 9 つのグループに分けられることを見出した⁵⁾。本研究において解析菌株を追加して、臨床分離株 354 株、環境分離株 397 株について MST 解析を行ったが、同様の結果が得られ、以前の解析結果が補強された。前研究班では、見られなかつ

た S2 に属する臨床分離株も 2 株収集され、全てのグループに臨床分離株が属することが明らかとなった。

感染源の解明のためには、臨床検体から、菌株を分離することが重要である。そのことが周知されるにつれて、医療機関から、保健所を通じて、地方衛生研究所に臨床検体が搬入され、菌株が分離されることが増えてきた。臨床分離株の遺伝子型を解析し、本研究で得られた MST のどこに位置するかを明らかにして、医療機関に還元することができるようになった。

表 1 *Legionella pneumophila* 血清群 1 臨床分離株 354 株の ST 分布

| No. of isolates | ST |
|-----------------|--|
| 29 | ST23 |
| 21 | ST120 |
| 19 | ST138* |
| 18 | ST1 |
| 11 | ST42 |
| 10 | ST384* |
| 8 | ST507* |
| 7 | ST89, <u>ST306*</u> , ST353* |
| 5 | ST505*, ST609, <u>ST679*</u> |
| 4 | ST131*, ST132*, ST142*, <u>ST211</u> , ST256, ST502*, <u>ST550*</u> , ST644* |
| 3 | ST2, ST118*, ST352*, ST530*, ST566*, ST642, ST687*, <u>ST973</u> , ST1077 |
| 2 | ST36, ST59, ST62, ST114, ST122*, <u>ST123*</u> , ST129; <u>ST139*</u> , ST143, ST224, <u>ST294</u> , ST739, <u>ST850*</u> , ST876*, <u>ST905*</u> , ST1187*, ST1480* |
| 1 | 109 kinds of STs |

* : 2015 年 9 月時点で、日本固有の ST。

下線を付したものは、2015 年 9 月時点で、環境分離株にはみられない ST。

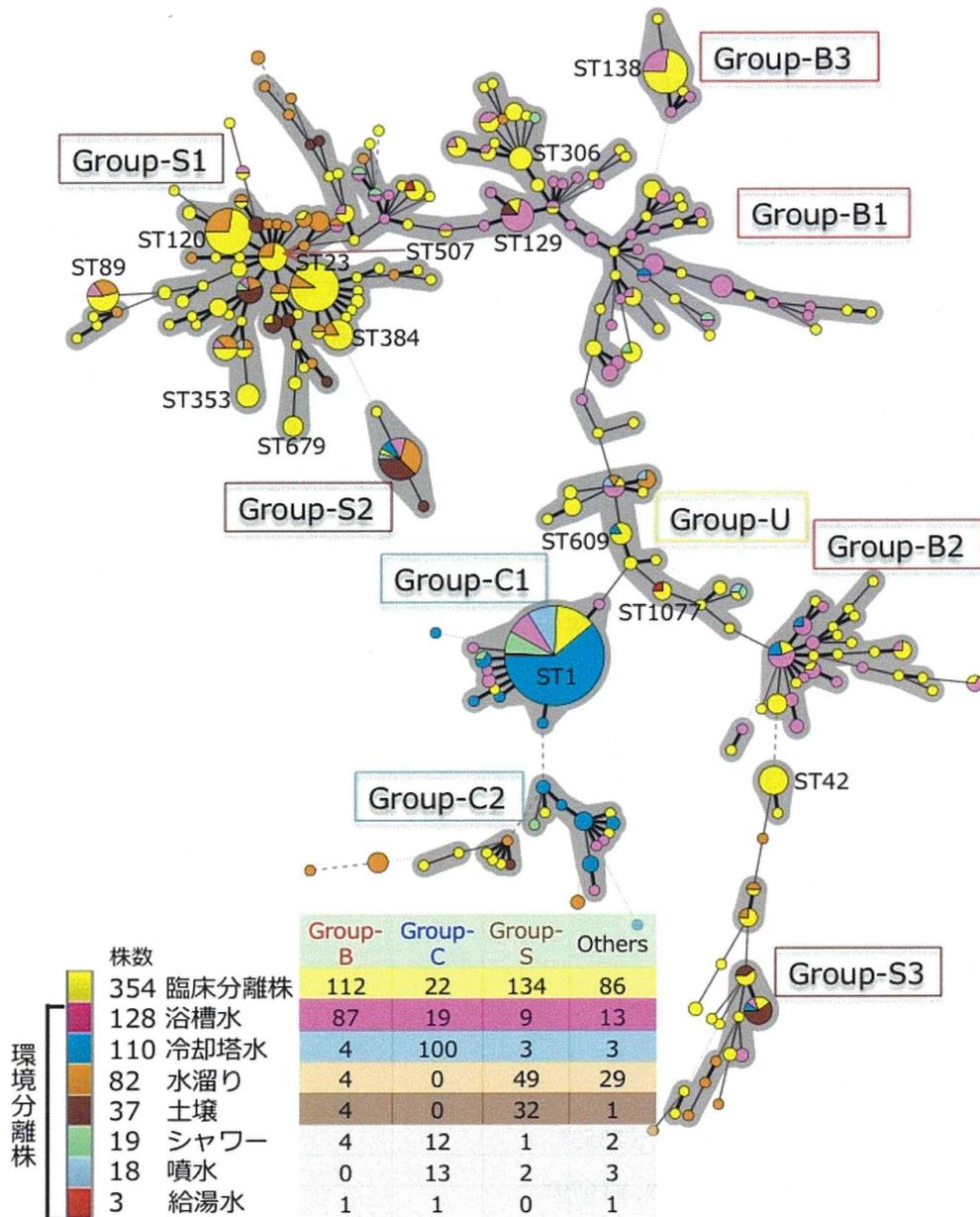


図1. 国内で分離された *L. pneumophila* 血清群 1 (751 株) の minimum spanning tree 図。

円の大きさはそれぞれの ST の株数に比例し、由来により異なる色で株を示している。ST をつなぐ枝は遺伝子座数の違いに比例して長くなっており、総枝長が最短になるように作図されている。隣り合う ST の遺伝子座の違いが 2 つ以下の場合、周囲が灰色に塗られており、大きいグループについては、Group-B1, B2, B3 は浴槽水分離株が主に属するグループ、Group-S1, S2, S3 は土壌および水たまり分離株が主に属するグループ、Group-C1, C2 は冷却塔分離株が主に属するグループ、Group-U はさまざまな由来からの分離株が属するグループである。臨床分離株もいずれかのグループに属するものが多い。

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）、内田順子（香川県環境保健研究センター）、江川武（文京区保健所）、緒方喜久代（大分県衛生環境研究センター）、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）、金澤祐子（和歌山市衛生研究所）、川上慶子（石川県保健環境センター）、川口定男（板橋区保健所）、北川恵美子（石川県保健環境センター）、小嶋由香（川崎市衛生研究所）、後藤考市（群馬県衛生環境研究所）、小堀すみえ（さいたま市健康科学研究センター）、佐原啓二（静岡県環境衛生科学研究所）、清水麻衣（京都市衛生環境研究所）白木豊（岐阜県保健環境研究所）、杉谷和加奈（熊本市環境総合センター）、鈴木匡弘（愛知県衛生研究所）、鈴木裕（山形県衛生研究所）、田中忍（神戸市環境保健研究所）、土屋祐司（浜松市保健環境研究所）、富田敦子（静岡市環境保健研究所）、富田隆弘（千葉県衛生研究所）、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）、長島史子（宇都宮市衛生環境試験所）、野田万希子（岐阜県保健環境研究所）、林千尋（尼崎市立衛生研究所）、福司山郁恵（熊本県保健環境科学研究所）、藤本仁美（世田谷区保健所）、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）、村上光一（福岡県保健環境研究所）、柳本恵太（山梨県衛生環境研究所）、山口友美（宮城県保健環境

センター）、吉田英弘（福岡市保健環境研究所）、吉野修司（宮崎県衛生環境研究所）、渡辺祐子（神奈川県衛生研究所）（敬称略）の諸氏に感謝いたします。

E. 参考文献

- 1) Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, Watahiki M. 2013b. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads, as determined by sequence-based typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:3959–3966.
- 2) 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.
- 3) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. 2007. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 45:1965-8.
- 4) Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application

of Simpson's index of diversity. J. Clin. Microbiol. 26:2465-2466.

- 5) 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

論文発表

- 1) 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. 2014. 20:390-393.
- 2) Suzuki H, Nishizuka M, Ara T, Watanabe M, Morita M, Sato C, Tsuchida F, Seto J, Amemura-Maekawa J, Kura F, Takeda H.: Reply to the letter to the editor by Edelstein PH. J. Infect. Chemother. 2015. 1:77.
- 3) Tomizawa Y, Hoshino Y, Sasaki F, Kurita N, Kawajiri S, Noda K, Hattori N, Amemura-Maekawa J, Kura F, Okuma Y. Diagnostic utility of splenic lesions in a case of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 2. Intern Med. 2015. 54:3079-3082.

邦文発表

- 1) 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 2013. 34:161-163.
- 2) 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 2013. 34:169-170.
- 3) 松田正法、重村久美子、徳島智子、吉田英弘、佐藤正雄、廣瀬みよ子、門司慶子、石津尚美、竹中章、前川純子. 病院内冷却塔からのレジオネラ感染疑い事例—福岡市. 病原微生物検出情報. 2015. 36:13-14.
- 4) 笠原ひとみ、関口真紀、中沢春幸、藤田暁、畔上由佳、高山久、千秋智重、関年雅、池田元彦、前川純子、倉文明. *Legionella pneumophila* 血清群9の症例について. 病原微生物検出情報. 2015. 36:14-5.

学会発表

- 1) Junko Amemura-Maekawa, Michiko Koyano, Toshio Yamazaki, Miyo Murai, Makoto Ohnishi, and Fumiaki Kura. Identification of *Legionella pneumophila* subspecies in clinical environmental isolates in Japan using the microplate DNA-DNA hybridization method. The 8th international conference on *Legionella*,

- Melbourne Australia, Oct.-Nov., 2013.
- 2) 前川純子、倉 文明、渡辺祐子、金谷潤一、磯部順子、田中 忍、中嶋 洋、吉野修司、大西 真：新しい *neuA* プライマーによる *Legionella pneumophila* 臨床分離株の sequence-based typing (SBT). 第 88 回日本感染症学会. 平成 26 年 6 月、福岡.
 - 3) 前川純子：レジオネラ症とレジオネラ属菌. 平成 26 年度レジオネラ属菌汚染防止対策講習会. 平成 26 年 7 月、宮崎.
 - 4) 前川純子：感染源調査に係る遺伝子型別の最新情報. 平成 26 年度生活衛生関係技術担当者研修会. 平成 27 年 2 月、東京.
 - 5) 前川純子：*Legionella pneumophila* の遺伝子型別から得られる知見. 平成 26 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会. 平成 27 年 2 月、岡山.
 - 6) 前川純子：レジオネラ. 平成 26 年度希少感染症技術研修会. 平成 27 年 2 月、東京.
 - 7) 前川純子、石井将仁、倉 文明、渡辺祐子、磯部順子、中嶋 洋、村井美代、大西 真：日本で分離された *Legionella pneumophila* 血清群 1 の sequence-based typing 法による解析. 第 88 回日本細菌学会総会. 平成 27 年 3 月、岐阜.
 - 8) 石井 将仁、倉 文明、前川 純子：水たまり中に生息するレジオネラ属菌の多様性に関する研究、第 88 回日本細菌学会総会. 平成 27 年 3 月、岐阜.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.

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、浴用水に加えて、それ以外の感染源を探求するため、環境中の *Legionella* 属菌の生息状況を調査した。3年間で調査対象としたのは、公衆浴場関連では浴用水 134 検体、シャワー水 111 検体、計 245 検体である。河川水は、患者発生の多い地域を流れる河川水、東部地域の主要河川、また、富山市内の市街地を流れる市中河川から採水した 81 検体である。土壌は、平成 25 年度は河川の周辺の 4 か所から、平成 26 年度は新たに幹線道路沿いの 6 か所と東部地域の河川周辺の 3 か所を追加した計 13 か所から採取した 97 検体である。浴用水およびシャワー水における検出率は浴用水では 22.7~35.9%、平均 28.4%、シャワー水では、15.6~29.4%、平均 22.5%で、その菌数はおよそ 6 割が 10-99CFU/100mL であった。河川水における *Legionella* 属菌の検出率は、全体では 28/85 検体 (32.9%) で、調査した 12 地点のいずれからも *Legionella* 属菌が検出されたが、患者発生地域との関連性については明らかにならなかった。これらの環境検体で、患者喀痰からもっとも多く分離される SG1 は、浴用水での分離が 18/37 検体 (48.6%) と多かった。一方、ウィンドウッシャー液中では、すべての菌が 10 分経過後には 50%以下、24h 後に生存する株は認められなくなり、界面活性剤の使用がレジオネラ症のリスクを軽減することを示した。

これまでの環境調査から、感染源の可能性として水溜りやウォッシャー液などを指摘してきたが、富山県におけるレジオネラ症発生が多い理由を明らかにすることはできなかった。患者発生を予防するには、富山県でおおよそ 4 割の患者の感染源と推定される浴用水の監視が重要であり、*lag-1* 遺伝子を保有する本菌について、患者発生との関連性とその検査法などについて、検討する必要がある。

A. 研究目的

レジオネラ症については、尿中抗原検査の普及等により、全国的に増加傾向にある¹⁾が、感染様式、感染経路など未だ解明されていないことが多い。富山県におけるレジオネラ症の発生状況は、平成 18~26 年ま

では 20~40 件で推移していたが、平成 27 年には 42 件ともっとも多く、増加傾向に歯止めがかかっていない状況である。これは全国でも同様の傾向であるが、対人口 10 万人の届出数 (3.84) が全国 (1.24) に比べかなり多い状況となっている。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%が浴用水との関連と推定されるが、46%は感染源が不明であった(図1)。この感染源不明の割合はこの10年間大きな変化はない。

そこで、富山県でレジオネラ症の発生予防に資するため、感染源不明となっている患者の感染源を明らかにすることを目的として、富山県の公衆浴場の浴用水に加えてシャワー水について、*Legionella* 属菌による汚染状況を調査すると共に、浴用水に関連しない環境として、河川水、土壌における分布状況を調査した。さらにこれらの検体から分離された *Legionella* 属菌について、STや *lag-1* 遺伝子の保有状況についても調査した。ウィンドウォッシャー液については、*Legionella* 属菌による汚染状況に加え、その液体中での生残性についても検討した。

B. 研究方法

Legionella 属菌による汚染状況

1. 材料

3年間で調査対象としたのは、公衆浴場関連では浴用水134検体、シャワー水111検体、計245検体である。浴用水に関連しない検体として、河川水は、平成25年度は患者発生の多い地域を流れる河川水から、平成26年度は平成25年度の河川水に加え、東部地域の主要河川(図2)から、また、平成27年度は富山市内の市街地を流れる市中河川(図3)から採水した81検体である。土壌は、平成25年度は河川の周辺の4か所から、平成26年度は新たに幹線道路沿いの6か所と東部地域の河川周辺の3か所を追加した計13か所から採取した97検体である。平成25年度に調査したウィンドウォッ

シャー液は協力の得られた2機関の職員等の所有する自動車から採取した41検体である。

2. *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²⁾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(400ml)と河川水(1,000mL)は、メンブランフィルター(直径47mm, 0.2 μ m, ミリポア社ポリカーボネート ISOPORE)で吸引ろ過し、フィルターを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(平成25年度未実施)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°C20分ヒートブロックで加熱)を行い、その100 μ LをGVPC培地(日水製薬)にコンラージ棒で広げて35°Cで培養した。ただし、酸処理検体は200 μ Lについて同様に培養した。結果は平均値ではなく、処理法に関わらず、最も多い菌数となった平板から菌数を算出した。

ウィンドウォッシャー液(100mL)はメンブランフィルター(直径47mm, 0.45 μ m, 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、土壌検体およびウィンドウォッ

シャー液はアメーバを用いて共培養した。河川水、ウインドウ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、古畑らの報告³⁾にしたがって調整したアメーバ培養液 200 μ L を添加後、35 $^{\circ}$ 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 μ L 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 $^{\circ}$ C 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⁴⁾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 (バイオメリュウ) 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。

④PCR によるレジオネラ属菌の遺伝子検出：環境検体から分離されたレジオネラ属菌およびウインドウッシャー液から抽出した DNA 検体について、PCR を用いて 16S rRNA 遺伝子⁵⁾を調べた。

⑤SBT : *L. pneumophila* SG1 について、ST を決定した。方法は前川の報告⁶⁾に準じて行なった。

⑥ *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⁷⁾したプライマー *lag-F* : 5' -CTCACAACAAGTCA AGCAAC-3' および *lag-R* : 5' -AAACCATAC CAAA GCAA

CAT-3' を用い、GoTaqG2 Hot Start Green Master Mix (Promega) (プロメガ) 10 μ L に *lag-F*, *lag-R* (2 μ M) をそれぞれ 2 μ L, テンプレート 1 μ L を加え、20 μ L になるよう H₂O を加え反応液とした。PCR は 95 $^{\circ}$ C 2 分の熱変性後、94 $^{\circ}$ C 30 秒、57 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分を 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C 5 分の条件で thermal cycler DICE (TaKaRa) でおこなった。

⑦ウインドウッシャー液の *Legionella* 属菌の生残性：供試菌株は BCYE- α (バイオメリュウ) で 35 $^{\circ}$ C 3 日間培養後、MacFarand2.0 となるよう生理食塩水に懸濁した。それを 10 倍段階希釈し、10⁻⁵液 1mL をウインドウッシャー液と PBS それぞれ 9mL に接種した。ボルテックスで混和したのち、経時的 (0分、10分、30分 60分そして、24 時間後) に、検水 100 μ L を BCYE α 2 枚にコンラージ棒で広げ、35 $^{\circ}$ C 7 日間培養し、菌数を測定した。この検討を 10 回実施した。

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 *Legionella* 属菌が検出された検体数を表 1 に示す。浴用水における検出率は 22.7~35.9%、平均 28.4%であった。シャワー水では、15.6~29.4%、平均 22.5%であった。陽性となった検体の菌数の分布を表 2 に示した。浴用水、シャワー水いずれもおよそ 6 割は 10-99CFU/100mL で、最も多かったのは、浴用水では 3,340cfu/100mL、シャワー水では 1,230CFU/100mL であった (データ未掲載)。

2. 河川水における *Legionella* 属菌検

出状況

河川水における *Legionella* 属菌の検出率を表 3 に示した。検出率は、全体では 28/85 検体 (32.9%) で、調査した 12 地点のいずれからでも *Legionella* 属菌が検出された。G 地点では調査 (4 回) のすべてで *Legionella* 属菌が検出された。患者発生の多い地域を流れる庄川での採水地点 A~D の 2 年間の検出率の平均は 13/44(29.5%)に対し、それ以外の神通川、常願寺川での採水地点 E~G の検出率の平均は 9/14 (64.3%)、また、平成 27 年度の市街地を流れる都市河川水で採水した地点 st1~st11 の検出率は 6/15 (40.0%) と、前者より高かった。

3. 土壌における *Legionella* 属菌の棲息状況

土壌における *Legionella* 属菌の検出率 (表 4) は、平成 25 年度では 8/20 検体 (40.0%)、平成 26 年度では 15/64 (23.4%) であった。*Legionella* 属菌検出率が 50.0% 以上を示したのは、No.3,4,7,9,11 の 5 地点であった。地点 3, 4 は平成 25,26 年度ともに 60~100%の検出率であったが、他の地点は 1 回の調査結果であるため、傾向等の解析はできていない。

4. 分離された *Legionella* 属菌の種および血清型

平成 25~27 年度の 3 年間に浴用水、シャワー水、河川水、土壌から分離された *Legionella* 属菌の種と血清群別の検体数を表 5 に示した。浴用水では、*L. pneumophila* では 10 の血清群が分離され、中でも SG1 が 18/66 検体(27.2%)と最も多くから分離された。シャワー水では UT 株が 12 検体 (32.4%) と多く、*L. pneumophila* では 8 の血清群が認められ、SG5 が 8/37 検体

(21.6%) と多くから分離された。河川水では UT が 14 検体 (35.9%) と多かった。*L. pneumophila* が分離された 25 検体では、SG6, SG1, SG3 がそれぞれ 8 検体、6 検体、6 検体で、これら 3 血清群が 8 割から分離された。土壌 33 検体では *L. pneumophila* の 7 血清群が分離され、SG1 が 10 検体(30.3%)、SG8 が 12 検体(36.4%) から分離され、2 血清群でおよそ 7 割を占めた。患者喀痰からもっとも多く分離される SG1 が分離された 37 検体中、浴用水での分離が 18 検体 (48.6%) と多かった。

5. *L. pneumophila* の SBT と *lag-1* 遺伝子保有状況

3 年間の調査で浴用水を含む環境検体から分離された、もしくは厚生センターで実施した浴用水検査で分離された *L. pneumophila* SG1, 51 株の ST と *lag-1* 遺伝子の保有状況について、結果を表 6 に示した。由来別に見ると、浴用水では SG124 株で 12 の STs が認められた。中では ST502,763 が各 5 株と多く、次いで ST1 (4 株) が多かった。この ST502 は患者喀痰からも分離されている型で、5 株全てが *lag-1* 遺伝子を保有した。シャワー水では、SG1 9 株に 7 STs が認められ、富山県の患者から特異的に分離される ST505 も分離された⁸⁾。河川水では SG1 7 株に 4STs が認められたが、患者喀痰から分離される ST は認められなかった。土壌では、SG1 11 株に 7STs が認められ、患者検体からの分離菌に認められる ST120 と ST739 が各 1 株認められた。ST502 の 5 株以外に太字で示した患者喀痰由来と同じ ST の 5 株も全てが *lag-1* 遺伝子を保有した。これに対し、患者から分離されていない STs の SG1,

42 株中, *lag-1* 遺伝子を保有したのは 8 株 (19.0%) と低かった。

6. 車のウィンドウォッシャー液におけるレジオネラ属菌検出状況

結果を表 7 に示した。調査したウィンドウォッシャー液 41 検体中, 1 検体 (2.4%) から *L. rubrilucens* が分離され, その菌数は 670 CFU/100 mL であった。また, アメーバを用いた培養法においても, 通常実施している培養法で分離された検体のみ, レジオネラ属菌が分離された。これに対し, *Legionella* の 16S rDNA の遺伝子検査では 12 検体 (29.3%) が陽性であった。

7. ウィンドウォッシャー液の *Legionella* 属菌の生残性

液体に接種した *Legionella* 属菌の経時ごとの菌数について, 10 回の平均値を図 4 に示した。PBS 液中では, いずれの *Legionella* 属菌も PBS(図 4a)では 1h 経過まではわずかに減少し, 24h 後でも接種菌数の 20~40% が生存した。これに対し, ウィンドウォッシャー液中では, すべての菌が 10 分経過後には 50% 以下の菌数となり, 24h に生存する株は認められなかった(図 4b)。

D. 考察

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, 目的にも書いたように, 患者のおよそ 4 割では浴用水との関連性が強く疑われたが, 多くの事例で感染源が特定されないのが現状である。これまでの研究から, 感染源が不明とされた患者喀痰から分離された *L. pneumophila* SG1 の ST120 について, 水

たまりから同 ST の菌が分離されるなど, これまで報告されていない環境にも感染源の可能性を示してきた⁸⁾。水たまりにおける *Legionella* 属菌の生息状況を踏まえ, また, 患者発生への偏りに注目し, この 3 年間では新たな感染経路を探求するとともに, 富山県での患者発生が多い理由について, 分離菌の細菌学的特性から考察した。河川水については, 土壌とともにその地域の浴用水との関連性を調べたが, 患者発生が多い地域と対象とした地域で採水した検体の間で *Legionella* 属菌の検出率に差は認められなかった。土壌においても, 患者発生地域や河川水との関連性を見いだせなかった。いずれにしろ, 調査回数が少ないので, 結論づけるには継続した調査が必要であろう。シャワー水における *Legionella* 属菌の検出率は, この 3 年間では浴用水のそれに比べ, わずかに低かった。しかしながら, 2013 年には富山県の患者喀痰から特異的に分離される ST505 も分離されており, レジオネラ症の感染源となっている可能性も確認された。ミスト発生リスクから浴用水以上の衛生管理が重要であり, 監視の継続が必要である。調査を始めて 4 年目となる 2015 年に *Legionella* 属菌の検出率が低かった。衛生指導による効果かもしれないし, 数あるシャワー水の中で, 採水したシャワーの検出率だけが低かったのかもしれない。シャワー水は, 一つの浴用施設に多く設置されており, すべてを検査するわけではないため, シャワー水の管理状況を的確に把握するための具体的な調査方法について検討が必要であると思われる。一方, ウォッシャー液については, これまでの調査で *Legionella* 属菌の生息環境

のひとつとなることを示し^{9,10)}、さらに界面活性剤の入ったウィンドウォッシャー液の中で *Legionella* 属菌は 24 時間後にはまったく生残しなかったことを示した。これは界面活性剤を使用することで、ウィンドウォッシャー液におけるレジオネラ症の感染リスクを低くできることを示した¹¹⁾。

このように身の周りの環境に着目し、レジオネラ症の感染源となりうる検体について提言してきたが、富山県で患者が多く届け出される理由については未だ解明できていない。感染経路を探求すると、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⁶⁾ 事実は、環境検体、とりわけ浴用水やシャワー水における *lag-1* 遺伝子を保有する本菌の検出率や汚染数が患者の発生と、より関連するであろうと推測される。したがって、富山県での患者発生について考察するには、他県との協力のもと、*lag-1* 遺伝子を保有する本菌の分布が地域のレジオネラ症患者発生と関連するかどうかについて調査する必要がある。加えて、感染源調査では *Legionella* 属菌による汚染状況だけでなく、*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。

感染源が解明されることは重要であるが、それが例えば水たまりのように、人工的でなく、自然環境である場合には、その衛生管理や対応方法は困難であることが予想できる。したがって、レジオネラ患者を減少させるためには、まずは、およそ 4 割の感染源と推定されている浴用水の衛生管理を徹底的に行うことが、最も確実な方法であると言わざるを得ない。感染源調査では患者と感染源疑い検体から分離された株の

ST の一致は必要条件である。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^{12,13)}。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。

結語

これまでの環境調査から、富山県におけるレジオネラ症発生が多い理由を明らかにするためには、新たな感染源の探求と共に、患者から分離されている *lag-1* 保有 *L. pneumophila* SG1 に注目した調査が必要であると思われる。

また、この *lag-1* 保有 *L. pneumophila* SG1 については、感染源調査の中で、選択的に分離する必要があると思われる。今後はこの方法について検討し、効率を上げる事が必要であろう。

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