

*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) Yamamoto H. 1992. Detection and identification of *Legionella* species by PCR. Nihon Rinsho. 50: 394-9. (In Japanese.)

6) 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.

7) 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.

8) Kanatani *et al.* 2013. 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: 3959-66.

9) 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 24 年度総括・分担研究報告書 pp.151-160.

10) 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 25 年度総括・分担研究報告書 pp.163-171.

11) 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.

12) 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.

13) 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

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

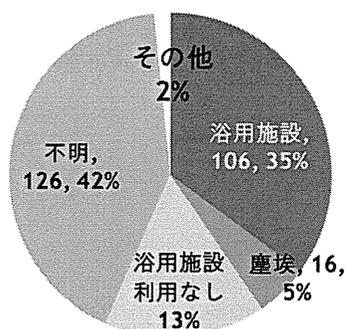


図1 レジオネラ症患者 302 人の感染源調査 (推定) (1999年～2015年, 富山県内)

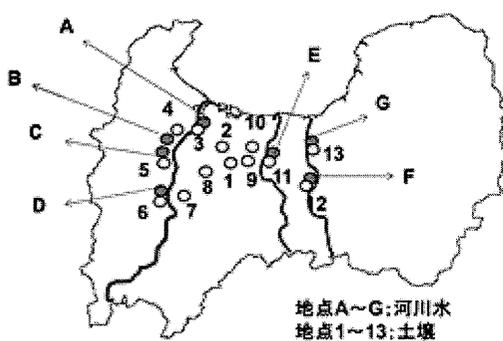


図2 河川水および土壌調査地点

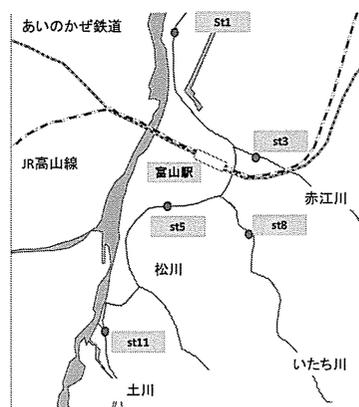


図3 河川水および土壌調査地点  
平成27年度市中河川水採水地点

表1. 浴用水, シャワー水における *Legionella* 属菌の陽性率 (2013～2015)

		平成25年度	平成26年度	平成27年度	合計
浴用水	検体数	39	44	51	134
	陽性数	14	10	14	38
	陽性率(%)	35.9	22.7	27.5	28.4
シャワー水	検体数	32	34	45	111
	陽性数	8	10	7	25
	陽性率(%)	25.0	29.4	15.6	22.5

表2. 浴用水におけるレジオネ属菌の検出菌数

菌数	検体数	
	浴用水	シャワー水
10未満	96	86
10 - 99	22	15
100 - 999	13	9
> 1000	3	1
合計	134	111

表 3. 河川水における *Legionella* 属菌陽性率

地点	河川	<i>Legionella</i> 属菌検出率		
		平成25年度	平成26年度	平成27年度
A	庄川	2/6	3/5	
B	庄川	3/6	1/5	
C	庄川	0/6	1/5	
D	庄川	2/6	1/5	
E	神通川		3/5	
F	常願寺川		2/5	
G	常願寺川		4/4	
st1	いたち川			1/3
st3	赤江川			1/3
st5	松川			1/3
st8	いたち川			1/3
st11	土川			2/3
陽性数/検体数 (%)		7/36 (19.4)	15/34 (44.1)	6/15 (40.0)

表 4. 土壌における *Legionella* 属菌の検出率

地点	場所・環境情報	<i>Legionella</i> 属菌の検出率 (陽性/検体数)	
		平成25年度	平成26年度
1	道路沿い		0/5
2	道路沿い		0/5
3	庄川付近	4/5	4/5
4	庄川付近	3/5	5/5
5	庄川付近	0/5	2/5
6	庄川付近	1/5	1/5
7	道路沿い		3/5
8	道路沿い		1/5
9	道路沿い		3/5
10	道路沿い		1/5
11	神通川付近		5/5
12	常願寺川付近		0/5
13	常願寺川付近		0/4
		8/20 (40.0%)	15/64 (23.4%)

表 5. *Legionella* 属菌 が分離された由来別検体数

<i>Legionella</i> 属菌	血清群	検体由来				計
		浴用水	シャワー水	河川水	土壌	
<i>L. pneumophila</i>	SG1	18	3	6	10	37
	SG2	2		1		3
	SG3	5	3	6	3	17
	SG4		2			2
	SG5	12	8	1	3	24
	SG6	10	2	8	3	23
	SG7					
	SG8	3	3		12	18
	SG9	4	2	1	1	8
	SG10	1	2	1		4
	SG12	1		1		2
	SG14				1	1
	SG15	2				2
	SG2-14	2				2
<i>L. micdadei</i>	4				4	
<i>L. dumoffii</i>			3		3	
UT	2	12	14		28	
		66	37	42	33	178

表6. 環境検体から分離された *L. pneumophila* SG1 の ST と *lag-1* 遺伝子保有状況

分離年	浴用水		シャワー水		河川水		土壌	
	ST	<i>lag-1</i> 遺伝子	ST	<i>lag-1</i> 遺伝子	ST	<i>lag-1</i> 遺伝子	ST	<i>lag-1</i> 遺伝子
2013	763	-	579	-	1599	-	18	+
	763	-	<b>505*</b>	+	127	-	48	-
	493	+			1599	-	1598	+
	493	+			1185	-	127	-
					1185	-	127	-
							48	-
2014	763	-	579	-	1139	-	48	-
	1802	-	579	-	1599	-	739	-
	<b>505*</b>	+	392	-			1224	+
	763	-					<b>739*</b>	-
	<b>502*</b>	+					<b>120*</b>	+
	1	-						
	<b>502*</b>	+						
	1	-						
	1	-						
	763	-						
2015	<b>1798*</b>	+	353	+				
	1	-	763	-				
	<b>502*</b>	+	2105	+				
	<b>502*</b>	+	1	-				
	<b>502*</b>	+						
	1095	-						
	278	-						
	129	-						
	1092	-						
	136	+						
総数	24株	(10/24)**	9株	(3/9)	7株	(0/7)	11株	(4/11)

\*太字 ST ; 患者喀痰から分離されている *legionella* 属菌の ST

\*\**lag-1* 遺伝子陽性率 ; 陽性株 / 検査した株数

表 7. ウィンドウォッシャーにおける *Legionella* 属菌の分離と 16SrDNA 遺伝子の保有割合

	レジオネラ属菌陽性率		遺伝子検索
			(PCR 法)
	培養法 (平板)	アメーバ培養法	16S rDNA
施設 A	0/19	0/19	3/19
施設 B	1/22	1/22	9/22
Total	1/41	1/41	12/41

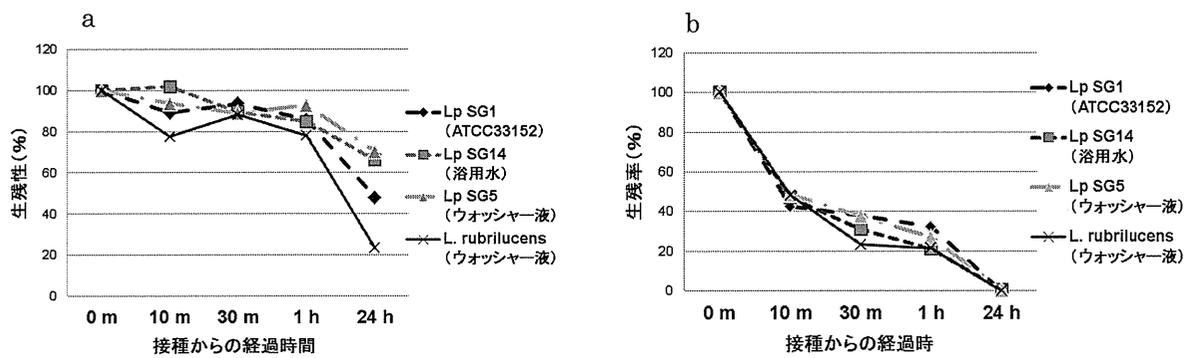


図 4. *Legionella* 属菌のウィンドウォッシャー液中での生残性

【接種液 : a; PBS b; ウィンドウォッシャー液】

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 25-27 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

県内のレジオネラ症患者由来株のうち、本県に地域特異的に検出されている *L.pneumophila* (Lp) 血清群(SG) 3 は、9 株すべてが sequence type (ST) 93 で、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。また、Lp SG1(ST609、ST1077)も同様に地域特異的に検出されていることから、これら患者の感染源を明らかにするため、環境検体のレジオネラ汚染調査を行った。3 年間に 282 検体について検査を行った結果、69 検体(24.5%)からレジオネラが検出されたが、上記の菌株ほどの検体からも検出されず、感染源の究明には至らなかった。このため、修景水等の未調査の検体に調査対象を拡大して、より多様な検体についてもレジオネラ汚染実態の調査が必要であると思われた。

### A.研究目的

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から分離された菌株を収集し、血清群別及び遺伝子解析を行っている。同時に、浴槽水等環境検体のレジオネラ汚染調査を継続実施し、患者由来株との関連を検討している。調査を進めていく中で、*L.pneumophila* (以下、Lp) 血清群(以下、SG) 3<sup>1)</sup>の患者由来株は、すべて 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、本県以外では未検出の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、患者由来株の Lp SG1(ST609 及び 1077)についても、本県に地域特異性の高い株であることが判明したことから、これらの感染源を明らかにして、感染予防対策の一助とするため、平成 25 年度

～27 年度に調査を実施した。

### B.研究方法

#### (1)材料

平成 25 年度～27 年度に、県内のレジオネラ症患者から分離されたレジオネラ 12 株を、収集した。また、浴槽水等 282 検体の環境検体を採取し、レジオネラの検査を実施した。一方、保健所等が浴槽水等から分離したレジオネラ 281 株も収集し、同定および血清群別を実施した。Lp SG3 と同定された菌株については、過去の調査で分離されたものも含め、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 寒天培地及び WYO α 寒天培地あるいは MWY 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 α 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・ゲル電気泳動(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

公衆浴場の浴槽水等 282 検体を検査し、その結果を表 1 に示した。レジオネラは 69 検体(24.5%)から検出され、浴槽水は内湯 41 検体(27.5%)と露天風呂 11 検体(23.9%)、原水・給湯水 1 検体(5.9%)、ジャグジー水 3 検体(33.3%)、シャワー水 1 検体(9.1%)、用水 7 検体(31.8%)、堆肥 5 検体(55.6%)が陽性であった。足湯及びペット湯の浴槽水、冷却塔水、河川水、湧水、湖水、池水、用水の土壌からは、検出されなかった。

分離菌は、浴槽水由来株は Lp SG1,2,3, 4,5,6,7,8,9,10,11,12,14, 群別不能(以下、UT)、原水・給湯水由来株は Lp SG1、ジャグジー水由来株は Lp SG3,6、シャワー水由来株は Lp SG3、用水由来株は *L. feeleii* SG1,2、*L. hackeliae* SG1&2、レジオネラ属菌(以下、*Legionella* spp.)、堆肥由来株は *L. londiniensis* SG1、*Legionella* spp. であった。

保健所等が分離したレジオネラを収集し、血清群別を実施した結果を、表 2 に示した。収集したレジオネラは 281 株で、浴槽水、原水、シャワー水、ジャグジー水、プール水、冷却塔水、トイレ給湯口水、風呂吐水口拭き取りから分離された。収集した菌株は、浴槽水は Lp SG1,3,4,5,6,8,9,10,12,UT、*L. anisa*、*L. micdadei*、*Legionella* spp. であった。原水は Lp SG1,3,8、*Legionella* spp.、シャワー水は Lp SG1,5,6、*Legionella* spp.、ジャグジー水は Lp SG1,3,5,6,9,10、*Legionella* spp.、プール水は Lp SG1,3,10、冷却塔水は Lp SG1,3,5,10,13,UT、*L. anisa*、*L. feeleii* SG1、*Legionella* spp.、トイレ給湯口水は Lp SG1、風呂吐水口拭き取りは Lp SG1 であった。

現在までに収集したレジオネラ症患者由来株は、表 3 に示した。平成 19 年以来、Lp SG1 は 24 株、Lp SG2 は 1 株、Lp SG3 は 9 株、Lp SG9 は 2 株、Lp SG10 は 1 株と *L. longbeachae* SG2 は 1 株の合計 38 株で、ほとんどが Lp であった。患者の症状については、Lp SG1 感染患者で重症化する傾向が見られ、発熱、咳嗽、頭痛、下痢などの症状以外に、呼吸困難、意識障害、肺炎などが多くの患者で見られた。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。一方、Lp SG3 感染患者は比較的軽症で、胸部異常影のみ観察された患者が、9 名中 4 名であった。糖尿病を基礎疾患に持つ患者では、死亡例が見られた。

患者由来株を SBT 法で解析した結果、Lp SG1 は多種類の ST に分類されたが、SG3 は 9 株すべてが同じ ST93 であった。

Lp SG1 について、ST により 751 株の MST 解析を行った結果を、図 1 に示した。県内の患者由来株で地域特異的に検出された ST609 や ST1077 は、いずれも感染源不明の臨床株が多い Group-U に属し、他の ST 株に比べてユニークな菌であった。

Lp SG3 株については、SBT 法に必要な 7 つの遺伝子のうち、*flaA* だけの塩基配列により、平成 26 年度に minimum spanning tree(MST)解析を行った結果は、図 2 に示した。

患者由来の ST93 株は *flaA3* のグループに属したが、clonal complex は形成しなかった。

患者由来の Lp SG 3(ST93)と、今までに分離・収集した環境由来の Lp SG3 について、PFGE 法を用いた遺伝子解析を行い、その結果を表 4 及び図 3 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、患者由来株のパターンと一致する菌株は無く、デンドロビウムによるパターンの類似度も低かった。

#### D. 考察

レジオネラレファレンスセンター活動として、平成 19 年より患者由来株を収集しているが、そのほとんどは Lp であり、SG1(24 株)、SG3(9 株)の順に検出頻度が高かった。また、平成 26 年度に初めて Lp 以外に *L.longbeachae* SG2 が分離された。患者由来株の遺伝子解析の結果、Lp SG3 はいずれも ST93 であり、PFGE パターンも一致したため、同一菌あるいは感染源が同じである可能性が高いことが推察された。しかし、ST 型別や PFGE パターンの比較でも、患者由来株と同一の環境由来株はなく、MST 解析でも患者由来株は他の株に比べてユニークなグループを形成していた。特に、浴槽水については、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、保健所等で分離された菌株も併せて、計 113 株の Lp SG3 について遺伝子解析を実施したが、患者と同じ ST 及び PFGE パターンの株は見つからなかった。このことから、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。一方、患者由来株の Lp SG1 のうち、ST609 及び ST1077 も SG3(ST93)と同様に地域特異的な株であることが確認されている。MST 解析の結果でも、いずれも groupU(感染源不明)に属し、他の ST 株に比べてユニークな菌であった。このことから、これらの菌株の感染源の究明に当たっては、今までの調査対象以外の検体についての調査が必要であり、噴水や人口滝などの修景水等についても、積極的な調査と行政が衛生管理状況や検査結果を把握できる制度作りが、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黒川幸徳先生、河口豊先生に、深謝いたします。

#### E. 結論

- 1) 平成 25～27 年度に、県内で発生したレジオネラ症の患者由来株について、Lp SG1 株 8 株、Lp SG3 株 1 株、Lp SG9 株 2 株と *L. longbeachae* SG2 株 1 株の計 12 株を収集した。
- 2) 患者由来株は合計 38 株となり、このうち Lp SG1(ST609 及び ST1077) と Lp SG3(ST93) は、本県に地域特異的な菌株であった。
- 3) これまでに分離・収集した浴槽水等由来の Lp SG3 株 161 株について、患者由来の Lp SG3(ST93) 株と ST 型別および PFGE パターンを比較した結果、患者由来株と同じ菌株はなく、感染源は明らかに出来なかった。
- 4) 同様に、患者由来の Lp SG1(ST609 及び ST1077) についても、現在まで本県の環境検体から同じ ST 株は検出されていない。
- 5) これらの患者由来株は、MST 解析では感染源不明の臨床株が多い group U に分類されたことから、感染源究明のためには今まで

の調査対象とは異なる多様な検体を調査する必要があると思われた。

#### F. 参考文献

- 1) 西山 明宏、石田 直、興梶 陽平、他：*Legionella pneumophila* serogroup 3 による呼吸器感染症の 4 症例。感染症誌 2011;85:373-379.
- 2) 常 彬、前川 純子、渡辺 治雄：レジオネラを解析するパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法の改良。IASR 2008 ; 29 : 333-334.
- 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(2013～2015年度)

検体名	検体数	陽性検体数	検出率(%)	検出菌種及び血清群	
浴槽水	内湯	149	41	27.5	<i>L.pneumophila</i> SG 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, UT
	露天風呂	46	11	23.9	<i>L.pneumophila</i> SG 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, UT
	足湯	1	0	0.0	
	ペット湯	1	0	0.0	
原水 給湯水	17	1	5.9	<i>L.pneumophila</i> SG 1	
ジャグジー水	9	3	33.3	<i>L.pneumophila</i> SG 3, 6	
シャワー水	11	1	9.1	<i>L.pneumophila</i> SG 3	
冷却塔水	2	0	0.0		
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		
用水の土壌	2	0	0		
堆肥	9	5	55.6	<i>L. londiniensis</i> SG 1, <i>Legionella</i> spp.	
計	282	69	24.5		

UT:○血清群別不能

表2 保健所等分離レジオネラ株 (2013～2015年度)

検体名	菌株数	検出菌種及び血清群
浴槽水	220	<i>L.pneumophila</i> SG 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, UT、 <i>L.anisa</i> , <i>L.micdadei</i> , <i>Legionella</i> spp.
原水	5	<i>L.pneumophila</i> SG 1, 3, 8, <i>Legionella</i> spp.
シャワー水	11	<i>L.pneumophila</i> SG 1, 5, 6, <i>Legionella</i> spp.
ジャグジー水	14	<i>L.pneumophila</i> SG 1, 3, 5, 6, 9, 10, <i>Legionella</i> spp.
プール水	3	<i>L.pneumophila</i> SG 1, 3, 10
冷却塔水	26	<i>L.pneumophila</i> SG 1, 3, 5, 10, 13, UT、 <i>L.anisa</i> , <i>L. feeleii</i> SG 1, <i>Legionella</i> spp.
トイレ給湯口水	1	<i>L.pneumophila</i> SG 1
風呂吐水口拭き取り	1	<i>L.pneumophila</i> SG 1
計	281	

UT:○血清群別不能

表3 患者由来レジオネラ株 (2007年～2015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					lag-1 保有	
									発熱	咳嗽	呼吸困難	意識障害	肺炎		その他
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*

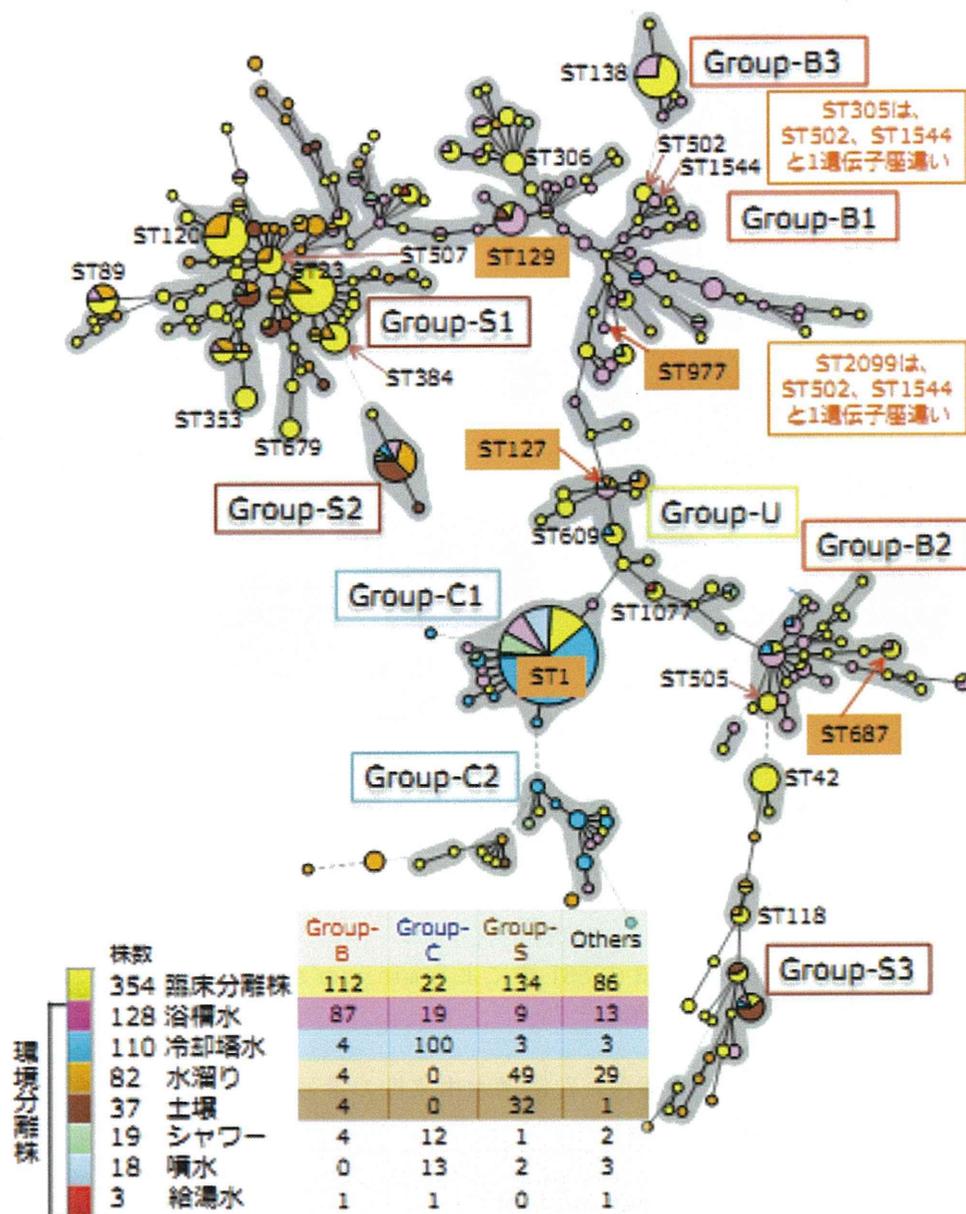


図1 *Legionella pneumophila* SG1(642株)の minimum spanning tree における環境由来 Lp SG1 (6種 ST:オレンジ文字) 9株の予想される位置 (感染研:前川純子先生)

- 遺伝子型別により、国内分離株の血清群1株には、9つの大きな遺伝的グループ (Group-B1, B2, B3, Group-S1, S2, S3, Group-C1, C2, Group-U) が存在した。
- Group-Bに属する臨床分離株(95株)の67%が浴槽水が感染源と推定・確定されており、感染源不明は29%だった。
- Group-Sに属する臨床分離株(116株)の55%が感染源不明で、28%が浴槽水が感染源と推定・確定された。
- Group-Uに属する臨床分離株(21株)、Group-Cに属する臨床分離株(21株)のそれぞれ10%が浴槽水が感染源と推定・確定されており、感染源不明はそれぞれ81%、86%だった。
- 畑仕事などの土壌や、塵埃などが感染源として推定されている患者由来株(20株)の75%がGroup-Sに属していた。

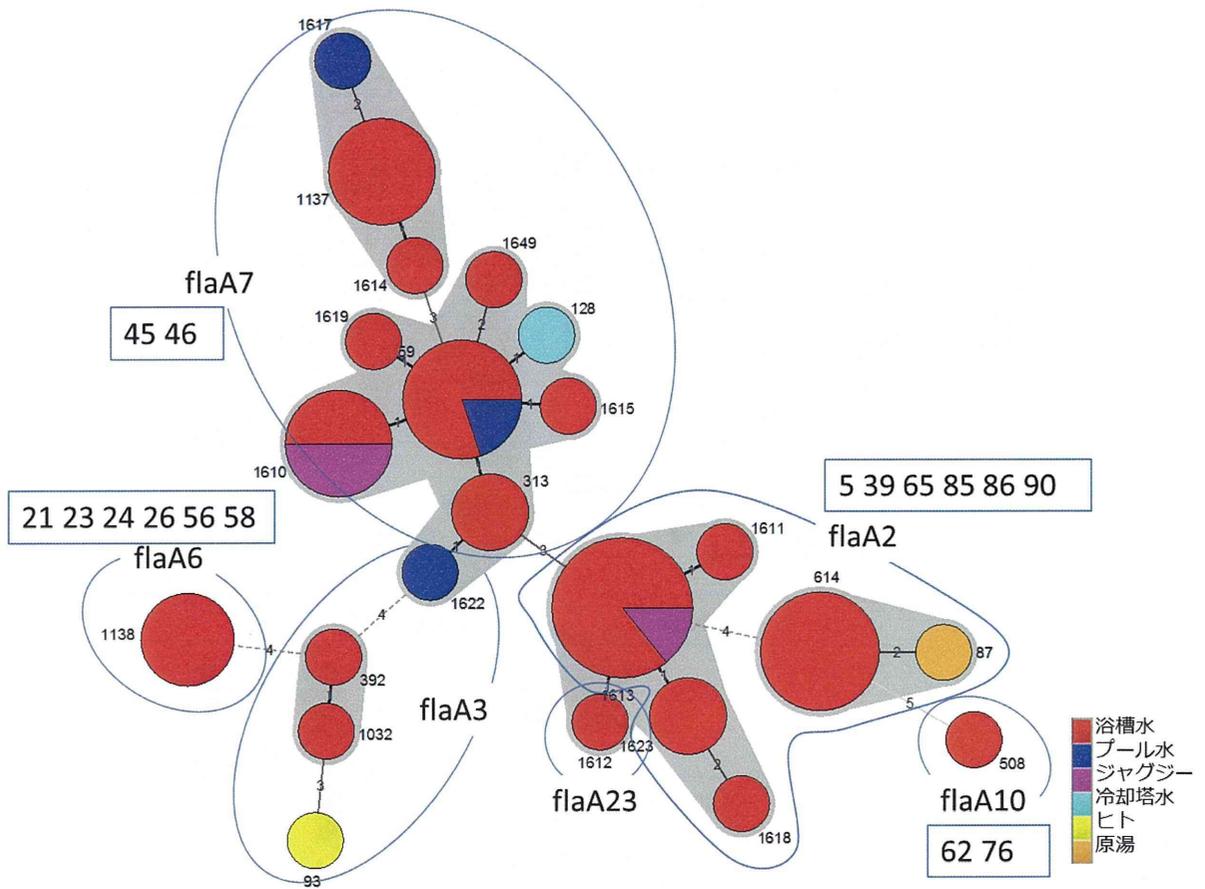


図2 *Legionella pneumophila* SG3 の SBT 法による minimum spanning tree における *flaA* との関係 (感染研:前川純子先生)

□内の数字は、本年度分離された浴槽水由来株の番号

円の大きさは菌株数を示す。

円の数字は 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。

線の中の数字は、7 つの locus の内いくつ違うかを示す。

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	バンドパターン数
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
フローミレ水	9	1
ろ過水	4	1
冷却水	3	3
シャワー水	1	1
患者	9	1
計	161	76

\*検体間の重複を含む

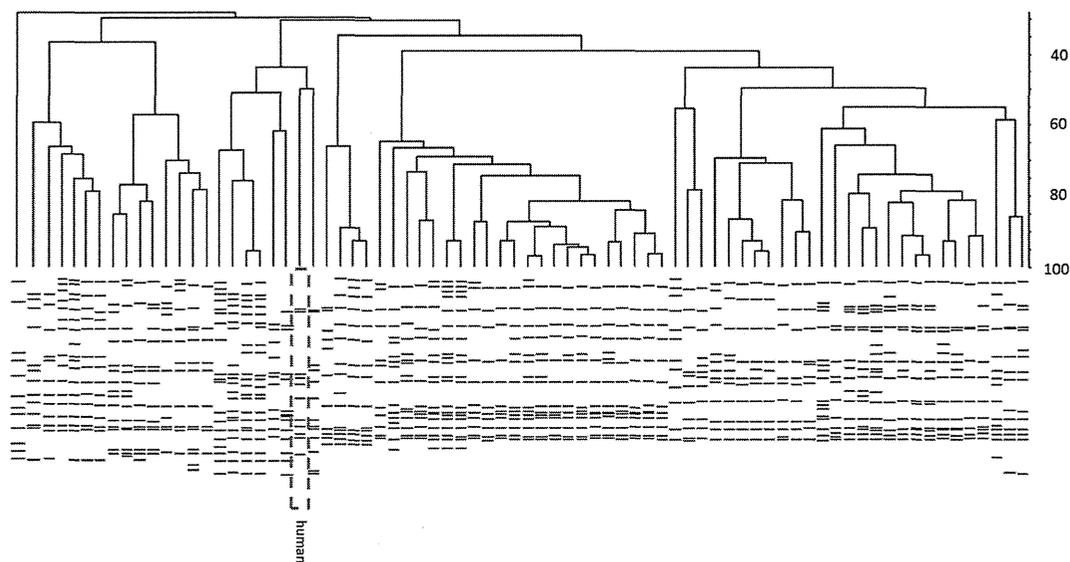


図3 患者および浴槽水等由来 *L. pneumophila* SG3 株の PFGE パターンと  
デンドログラム解析結果

平成 25-27 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
研究分担者	八木田健司	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	渡辺祐子	神奈川県衛生研究所微生物部
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 25 年度と平成 26 年度は家庭内における *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。2 年間で 19 軒の家庭の協力を得て、水試料 149 検体、スワブ検体 90 検体を対象に、*Legionella* DNA の検出及び培養によるレジオネラ属菌の検出、さらにアメーバ共培養によるレジオネラ属菌の増菌後の DNA 及び菌の検出を行った。アメーバ共培養により検出率が向上し、レジオネラ DNA は水試料では 77 検体 (51.7%)、スワブ試料では 17 検体 (18.9%) から検出された。水試料では洗濯機 (92.9%)、水槽 (86.7%)、浴槽水 (58.3%)、給湯水 (52.9%)、スワブ試料では給湯口 (53.8%) での検出率が高かった。*Legionella* 属菌は水試料では 9 検体 (6.0%)、スワブ試料では 3 検体 (3.3%) から検出され、*L. pneumophila* SG1 が給湯水と浴槽洗浄用スポンジから検出された。

平成 27 年度は、浴槽と付随設備、給水系の *Legionella* 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。入浴施設の 1 施設では、浴槽から *Legionella* 属菌は検出されなかったが、*Legionella* DNA 及び *Legionella* 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。別の入浴施設では、浴槽水 1 検体と浴槽壁のスワブ試料 1 検体から *Legionella* 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。さらに別の入浴施設は限られた利用日でのみ浴槽に湯を張り、そのつど清掃していたため、*Legionella* の汚染は少なく、蛇口水とシャワー水から *Legionella* DNA が検出されただけであった。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

*Legionella* 属菌は、人工環境を含む様々な水環境に生息していることが知られており、これらが感染源となって *Legionella* 感染症が発生している。国内の *Legionella* 感染症は入浴施設、冷却塔などが主要な感染源であることが知られている。そのため、入浴施設や給湯施設、冷却塔における *Legionella* 属菌の汚染状況に関する多くの調査が報告されている。一方で、家庭内で使用されている通常の浴槽や 24 時間風呂が原因となった症例が報告されているものの、家庭内の水環境における *Legionella* 属菌の汚染状況に関する調査は限られている。

そこで本研究では平成 25 年度と平成 26 年度に、一般家庭の水環境における *Legionella* 属菌の汚染状況について調査し、平成 27 年度は入浴施設と医療機関の入浴設備、給水系等における *Legionella* 属菌の汚染の実態を明らかにし、家庭、入浴施設及び医療機関における *Legionella* 感染のリスクを把握し、感染予防対策策定に役立てることを目的として実施した。

## B. 研究方法

### 1) 試料の採取

試料は水試料およびスワブ試料とした。採水時に水試料の温度を測定し、実験室に搬入後に pH、残留塩素濃度、ATP 値を測

定した。

### 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、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) で 5ml に濃縮した。スワブ試料は 50 倍希釈 PBS の 5ml に浮遊した。酸処理と加熱処理を行い、試料の 100 $\mu$ l を GVPC  $\alpha$  寒天平板培地 (Oxoid)、WYO  $\alpha$  寒天平板培地 (栄研化学)、MWY 寒天平板培地 (Oxoid) に塗抹し、36 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。

### 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。

### 4) アメーバによる *Legionella* 属菌の増殖

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 1.0ml を、無菌的に継代培養している *Acanthamoeba castellanii* を浮遊させた 3ml の 50 倍希釈 PBS に接種し、25 $^{\circ}$ C で 3~5 日間培養した。培養液を酸で処理し、培養液を pH2.2 緩衝液で 4 分間酸処理し、100 $\mu$ l ずつを GVPC  $\alpha$  寒天平板培地 (Oxoid) および WYO  $\alpha$  寒

天平板培地（栄研化学）に塗抹し、36℃で7日間培養した。

#### 5) *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。

#### 6) アメーバの分離

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℃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。

#### 7) 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℃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) 家庭環境

直接検査では水試料 149 検体中 54 検体 (36.2%) 及びスワブ検体 90 検体中 10 検体 (11.1%) から *Legionella* DNA が検出されたが、アメーバ共培養により検出率が向上し、水試料では 77 検体 (51.7%)、ス

ワブ検体では 17 検体 (18.9%) から検出された。*Legionella* 属菌は水試料では 9 検体 (6.0%)、スワブ検体では 3 検体 (3.3%) から検出され、*L. pneumophila* SG1 は給湯水と浴槽洗浄用スポンジから検出された。検出されたその他の *Legionella* 属菌は水試料からは *L. anisa*、*Legionella* sp. L-29、*L. busanensis*、*L. sainthelensi*、*L. anisa*、*L. rowbothamii* が、スワブ検体では *L. anisa*、*Legionella* sp. L-29、*Legionella* sp. が検出された。

#### 2) 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。

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のみ浴槽に湯を張り、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 が検出されただけであった。

### 3) 医療機関

神奈川県内の3か所の医療機関(D、E、F)において調査を実施した。医療機関での試料の採取は平成27年10月26日から平成27年11月18日に行った。調査の対象とした医療機関は200床以上を有し、主要診療科を設置している。

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。

### D. 結論

家庭の水環境が*Legionella*属菌に汚染され、環境によっては高率に汚染されていることが明らかになった。また、*L. pneumophila* SG1による汚染が存在することも明らかとなった。家庭環境においても水環境におけるレジオネラ汚染に対する対応が必要であることが示された。

入浴施設と医療機関の*Legionella*属菌の汚染率は施設により異なっていた。この

汚染率の調査することで汚染対策につながる情報が得られることが考えられる。入浴施設では、浴槽の洗浄が不十分であることが浴槽水での*Legionella*属菌の検出に関連していることが推定された。医療機関の給水系における*Legionella*属菌汚染は、塩素濃度を0.2mg/ml以上に上げることで防ぐことができるとのデータが得られ、給水系の残留塩素濃度の維持が効果があると推測された。今後、汚染防止対策を実証するための調査が必要であると思われる。

### E. 健康危険情報

なし

### F. 研究発表

T Kuroki, H Teranishi, Y Watanabe, K Arai, K Sugiyama, H Nakajima, M Sasaki, M Fujita, J Isobe, T Taguri, K Ogata, I Yamane, F Kura: ATP bioluminescence assay as an indicator of bacterial counts and risk for *Legionella* occurrence in bath water. The 2nd Meeting of European Study Group of *Legionella* Infections 2014, Sept.17 ~ 19, Barcelona, Spain, 2014.

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚労科研(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」  
総合研究報告書

レジオネラ感染とアメーバ  
アメーバのレジオネラ受容体の解析

研究分担者 八木田健司 国立感染症研究所寄生動物部

研究要旨：レジオネラ属菌のアメーバ感染における糖鎖の関与を調べることで感染受容体の特性を明らかにし、また糖鎖を応用した感染制御の可能性に関して検討を行った。レジオネラ属菌とアメーバの感染実験、およびレクチンと糖質の感染への影響を定量解析し、受容体の特性を調べた。感染実験からアカントアメーバをモデル実験用アメーバに選択した。受容体の局在は明らかにできなかったが、その構成糖鎖残基に関する知見を得た。また感染抑制および促進効果のあるレクチンならびに糖質を明らかにした。促進効果のあったヘパリンは、アメーバに対するレジオネラ属菌感染能力の回復効果があること、またその効果が培養能力の低下した菌をアメーバを用いて検出する上で有用であることを明らかにした。

#### A. 研究目的

レジオネラ属菌が自然環境あるいは人工水系環境で定着、増殖するための生物学的な要因として *Acanthamoeba* 等の自由生活性アメーバ類があり、菌はこれらに接着、感染し細胞内増殖することにより環境中で生存することができる。これは、菌のアメーバ感染を制御することが環境のレジオネラ汚染の制御にもつながることを意味するが、菌のアメーバ感染の機序については知見が少なく、想定される受容体の特性も明らかではない。本研究では多くの病原体感染においてその重要性が指摘されている糖鎖に注目し、レジオネラ属菌のアメーバ感染における糖鎖の関与を調べることで受容体の特性を明らかにし、また糖鎖を応用した感染制御の可能性に関して検討を行った。

#### B. 研究方法

初年度は *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感染適合性を調べた。*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。

次年度は *L. pneumophila* SG1と、最も菌感受性が高く、属として感染性が一定していると考えられたアカントアメーバを用い、糖鎖結合性タンパク質のレクチンおよびその結合糖の存在および作用を、染色や凝集実験および菌-アメーバ感染実験により解析した。

最終年度は、菌-アメーバ感染実験系を用いて、レクチンおよび糖質の感染抑制および促進効果を明らかにし、これを応用することでアメーバを増幅装置として微量の菌を増幅する方法を検討した。

#### C. 研究結果

初年度は、環境および臨床検体由来の *L. pneumophila* に対し、アカントアメーバ株はすべて感染し、アメーバの中で最も高い菌への感受性を示した。*Acanthamoeba* はすべてのグループの菌に感染したが、*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。なお